

Aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

DIE WIRKUNG VON (+)-CATECHIN UND ANDEREN FLAVONOIDEN AUF ENZYME DES HISTAMINSTOFFWECHSELS IN VITRO UND IN VIVO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
HEINZ NUSIME
aus Haina/Kloster

Marburg 1976

Aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz)

an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

DIE WIRKUNG VON (+)-CATECHIN UND ANDEREN FLAVONOIDEN AUF ENZYME DES HISTAMINSTOFFWECHSELS IN VITRO UND IN VIVO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
HEINZ NUSIME
aus Haina/Klöster

Marburg 1976



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 11. Juni 1976
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. H. Gepen
Referent:	Prof. Dr. med. W. Lorenz
Correferent:	Prof. Dr. med. H. Hamelmann

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Übersicht über die Stoffwechselwege des Histamins	1
1.2. Probleme bei der Untersuchung der Hemmung der Histaminbildung	6
1.2.1. Antihistaminika und Decarboxylaseblocker	6
1.2.2. Methoden zur Messung der in vivo Hemmung der Histaminbildung	8
1.3. Flavonoide als entzündungshemmende und permeabilitätshemmende Stoffe : potentielle Kandidaten für Hemmstoffe der Histaminbildung	9
2. Ziel der Arbeit	12
3. Material und Methodik	13
3.1. Material	13
3.1.1. Versuchstiere	13
3.1.1.1. Gewinnung von Magengewebe	13
3.1.1.2. Versuche zur Histaminbildung in vivo	13
3.1.1.3. Versuche zur Streßulcusbildung	15
3.1.2. Enzympräparate	16
3.1.2.1. Spezifische Histidindecaboxylase aus Rattenmagen	16
3.1.2.2. Histaminmethyltransferase aus Schweineantrum	19
3.1.2.3. Diaminoxidasen aus Schweinedarm und Schweineniere	19

	Seite
3.1.3.	Reagentien 20
3.2.	Methoden 22
3.2.1.	Bestimmung der Histidindecaboxylase- aktivität mit einer Nichtisotopen- methode 22
3.2.2.	Bestimmung der Histidindecaboxylase- aktivität mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode 23
3.2.3.	Radioisotopenmethode mit ^{14}C -S-Adenosyl- L-Methionin für die Bestimmung der Histaminmethyltransferaseaktivität 26
3.2.4.	^{14}C -Putrescin-Test für die Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität 26
3.2.5.	Bestimmung der Histaminausscheidung im 24h-Urin der weiblichen Ratte 27
3.2.6.	Methoden zur Erzeugung von Streßulcera bei weiblichen Ratten 28
3.2.7.	Statistische Methoden 29
4.	Ergebnisse 29
4.1.	Bestimmung der Histidindecaboxylase- aktivität im Rattenmagen mit Hilfe der fluorometrischen Methode für Histamin und der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode 29
4.2.	Anreicherung der Histidindecaboxylase aus Rattenmagen 30
4.3.	Wirkung von Flavonoiden auf die spezifische Histidindecaboxylase des Rattenmagens in vitro 32
4.3.1.	Effekt auf die spezifische Histidin- decaboxylase im Rohextrakt ($^{14}\text{CO}_2$ -Methode) 32

4.3.2.	Effekt auf die spezifische Histidin-decarboxylase nach Anreicherung des Enzyms (fluorometrische Methode)	32
4.3.3.	Wirkungsmechanismen der Hemmung der Histidindecaboxylase aus Rattenmagen durch (+)-Catechin	35
4.4.	Wirkung von Flavonoiden auf die Histaminmethyltransferase in vitro	35
4.5.	Wirkung von (+)-Catechin auf die Diaminoxydase von Schweinedarm und -niere in vitro	37
4.6.	Wirkung von (+)-Catechin auf die Histaminausscheidung im 24h-Urin der weiblichen Ratte	37
4.7.	Wirkung von (+)-Catechin auf die Streßulcusbildung bei der weiblichen Ratte	41
5.	Diskussion	44
5.1.	Indikationen für die Applikation von Histidindecaboxylaseblockern beim Menschen	44
5.2.	Brauchbarkeit von (+)-Catechin als Histidindecaboxylasehemmstoff beim Menschen	46
6.	Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis		52

1. Einleitung

1.1. Übersicht über die Stoffwechselwege des Histamins

Die Geschichte der Untersuchungen des Histaminstoffwechsels ist so alt wie die Entdeckung des Histamins als Naturstoff. 1910 wurde Histamin als Produkt von Histidindecaboxylierung in Bakterien erstmals nachgewiesen (2).

Die ersten Ergebnisse über die Fähigkeit des Säugerorganismus, Histamin zu inaktivieren, stammen von Eustis (21) aus dem Jahr 1915. Das erste Enzym, welches Histamin im Säugerorganismus inaktivierte, beschrieb Best (11) 1929 als "Histaminase". Aufgrund ihrer Substratspezifität wurde von Zeller (83) die Bezeichnung "Diaminoxidase" vorgeschlagen.

Werle (79), Holz und Heise (29, 31) wiesen unabhängig voneinander im tierischen Organismus erstmals Histidindecaboxylase nach, die Histidin zu Histamin decarboxyliert.

Dieses Enzym war die erste Aminosäuredecarboxylase, die entdeckt wurde.

Einige Jahre später wurden weitere Wege der Histamininaktivierung aufgeklärt: N-Acetylierung (59), Methylierung im Ring (44), Ribotidbildung (22), Nucleotidbildung (5) und Transaminierung (32).

Die Histaminase bzw. Diaminoxidase sowie die Histaminmethyltransferase sind aber auch heute noch die Enzyme, deren Aktivität bei Untersuchungen über Histamininaktivierung fast ausschließlich bestimmt werden, während die übrigen Abbauewege - sehr zu Unrecht - nicht berücksichtigt werden.

Übersichten über den Histaminstoffwechsel wurden von zahlreichen Autoren verfaßt: Guggenheim (27), Werle (80), Tabor (74), Schayer (66), Daly und Witkop (17), Lorenz und Pfleger (47).

In Abb. 1 sind die bisher bekannt gewordenen Wege des Histaminstoffwechsels zusammengefaßt. Histamin entsteht durch die Decarboxylierung von L-Histidin. Diese Reaktion wird durch Histidindecaboxylase (HDC) katalysiert. Seine Inaktivierung oder sein Abbau erfolgt hauptsächlich über drei Reaktionsketten:

a) durch Methylierung des Ringes in Stellung 1 (τ) durch die spezifische Histaminmethyltransferase (HMT) und nachfolgende oxydative Desaminierung der Seitenkette durch Aminoxydasen vom Typ der Monoaminoxydase (MAO). Der entstehende Aldehyd wird hauptsächlich zu Methylimidazolessigsäure oxydiert, und zwar durch die Xanthinoxydase oder Aldehyddehydrogenase. Die Methylimidazolessigsäure wird im Urin ausgeschieden, und beim Menschen als der wichtigste Metabolit des Histamins zur Bestimmung des Histaminstoffwechsels in vivo angesehen. Ferner wird τ -Methylimidazolacetaldehyd nicht-oxydativ umgesetzt, z.B. durch Reduktion zum entsprechenden Alkohol oder durch Kondensation mit aromatischen Verbindungen (Schayer 66, 68). Methylimidazolessigsäure kann schließlich noch zyklische Verbindungen bilden, wie Anemonin, das aber bisher nur in niederen Tierstämmen nachgewiesen werden konnte (3, 4).

b) Ferner wird Histamin auch ohne vorherige Methylierung am Imidazolring durch die Diaminoxydase (DAO) oxydativ desaminiert. Der entstehende Imidazolacetaldehyd wird überwiegend durch Xanthinoxydase oder Aldehyddehydrogenase zur Imidazolessigsäure oxydiert. Zu geringerem Umfang erfolgt die Reduktion des Aldehyds zu 4'(5')-Imidazoläthan-2-ol (62), eine Ringspaltung durch Bakterien (66, 68) und möglicherweise auch Bildung von Kondensaten wie beim τ -Methylimidazolacetaldehyd (68). In Gegenwart von ATP reagiert die Imidazolessigsäure mit Pyrophosphat-ribosylphosphat unter Bildung von Imidazolessigsäureribotid (16). Diese Reaktion

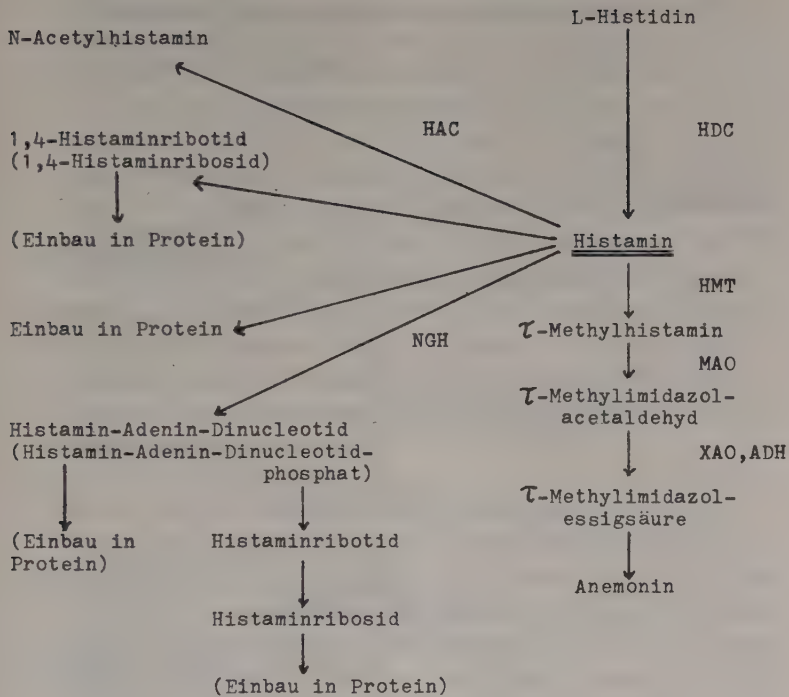


Abb. 1 : Stoffwechselwege zur Bildung und Inaktivierung des Histamins (1. Teil)

Zu Abb. 1 : Abkürzungen

HDC: Histidindecarboxylase, HAC:Histamintransacetylase,
 NGH:NAD(P)-Glycohydrolase, SPT:saure Phosphatase,
 HMT:Histaminmethyltransferase, MAO:Monoaminoxydase,
 XAO:Xanthinoxydase, ADH:Aldehyddehydrogenase,
 DAO:Diaminoxydase, HTA:Histamintransaminase.

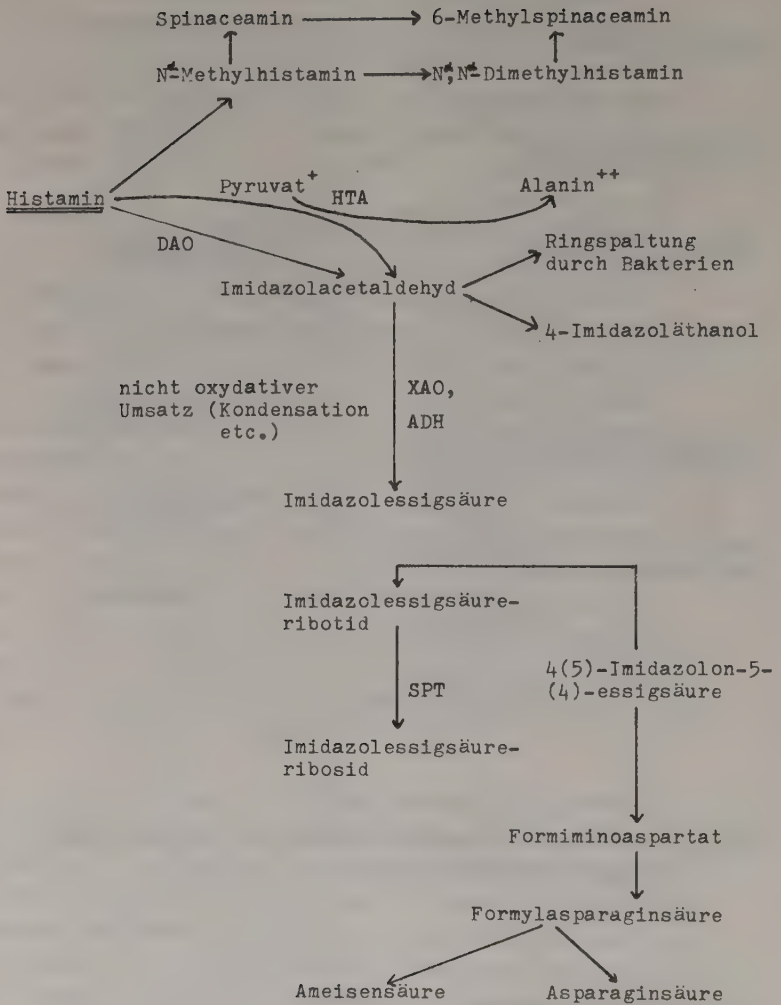


Abb. 1 : Stoffwechselwege zur Bildung und Inaktivierung des Histamins (2. Teil)

wird durch eine Pyrophosphatribosylphosphattransferase katalysiert, die aus Kaninchenleber 60-fach angereichert werden konnte. Unter der Einwirkung von saurer Phosphatase entsteht Imidazolessigsäureribosid, eine Verbindung, die im Urin verschiedener Säugetierarten (75, 41, 36) und im Gewebe von Ratten (65) nachgewiesen wurde. Ein weiterer Umsatz von Imidazolessigsäure wurde bisher nur bei Bakterien (*Pseudomonas fluorescens*) aufgefunden. Nach Oxydation zu 4-Imidazolonesigsäure kommt es zu hydrolytischer Spaltung des Imidazolringes unter Bildung von Formiminoasparaginsäure, die durch weitere Hydrolyse zu Formylasparaginsäure und Ammoniak umgesetzt wird. Schließlich entsteht aus Formylasparaginsäure Asparaginsäure und Ameisensäure (58). Ob diese Reaktionskette im Säugerorganismus vorkommt, ist nicht bekannt.

c) Als weiterer Hauptweg der Histamininaktivierung im Säugerorganismus darf heute schon die Histaminnucleotidbildung angesehen werden (6). Nicotinsäureamid im NAD⁺ und NADP⁺ wird unter Katalyse der Diphosphopyridinnucleotidase (NAD(P)-Glycohydrolase) durch Histamin ersetzt unter Bildung von HAD⁺ und HADP⁺. Diese Dinucleotide können in säureunlösliche Proteine eingebaut (6) oder in Gegenwart von Phosphodiesterase aus Schlangengift zu Histaminribonucleotid umgesetzt werden (61). Mit saurer Phosphatase aus menschlicher Prostata entsteht aus Histaminnucleotid unter Abspaltung von Phosphat Histaminribosid (61), das ebenfalls in Protein eingebaut werden kann (6).

Histamintransaminierung wurde von Ito et al. (32) beschrieben. Die Aminogruppe in der Seitenkette des Histamins wird in Gegenwart von Mitochondrien und Mikrosomen aus Kaninchenleber und -niere auf Pyruvat, Phenylpyruvat und p-Hydroxyphenylpyruvat übertragen. Der entstehende Imidazolacetaldehyd wird zu Imidazolessigsäure oxydiert. Die

Bedeutung der Histamintransaminierung im Säugerorganismus ist nicht bekannt, da bisher hierüber sehr wenige Untersuchungen vorliegen.

Auch die Methylierung des Histamins in der Seitenkette zu N^M-Methylhistamin und N^M,N^M-Dimethylhistamin konnte im Säugerorganismus durch das Auffinden dieser Metaboliten im Urin des Menschen nachgewiesen werden (40). Auch in der Haut südamerikanischer Amphibien (*Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus*) wurden N^M-Methylhistamin, N^M,N^M-Dimethylhistamin sowie die zyklischen Imidazolalkylamine Spinaceamin und 6-Methylspinaceamin aufgefunden (20).

Die N-Acetylierung des Histamins wurde in der Kaninchen- und Taubenleber (59), in Lungen- und Nervengewebe des Rindes (81) und bei Bakterien (77) nachgewiesen. Die Bedeutung dieser Histamininaktivierung in den einzelnen Geweben wurde bisher nicht untersucht.

Histamin reagiert auch direkt, ohne den Umweg über die Histamin-Adenindinucleotidbildung, mit dem Ribotid oder Ribosid des Nicotinamids (1), wobei Histaminribotid oder Histaminribosid entsteht. Dieselben Verbindungen gehen auch aus der Reaktion zwischen Pyrophosphatribosylphosphat und Histamin in Gegenwart von ATP hervor (22). Histaminribosid wird zum Teil in Proteine eingebaut (6).

1.2. Probleme bei der Untersuchung der Hemmung der Histaminbildung

1.2.1. Antihistaminika und Decarboxylaseblocker

Antihistaminika vom H₁- und H₂-Typ blockieren freigesetztes Histamin an den Rezeptoren. Ein anderer Weg zur Ausschaltung von Histaminwirkungen besteht in einer Hemmung seiner Bildung. Deshalb sind zur Erforschung der physiologischen und

pathophysiologischen Funktionen des Histamins Enzym-inhibitoren im Histaminstoffwechsel von größter Bedeutung.

Hinzu kommt, daß im Gegensatz zu einigen anderen biogenen Aminen wie Azetylcholin und Serotonin Histaminrezeptor-antagonisten nicht in der Lage sind, viele Wirkungen dieser Substanz bei massiver Histaminfreisetzung ausreichend zu verhindern. Eine kombinierte Behandlung mit Antihistaminika und Decarboxylaseblockern ist deshalb anzustreben.

Leider sind die wirkungsvollsten Histidindecaboxylase-hemmstoffe, wie z. B. das 3-Hydroxy-4-Bromobenzyloxyamin (Brocresine), α -Hydrazinohistidin und Semicarbazide in ihrer Wirkung unspezifisch und toxisch. Unspezifisch sind sie deswegen, weil sie nicht nur die Histaminbildung, sondern teilweise auch die Histamininaktivierung blockieren und außerdem viele pyridoxalphosphatabhängige Enzyme im Organismus hemmen, wie Decarboxylasen anderer Aminosäuren und Transaminasen.

Hieraus erklärt sich auch zum größten Teil ihre ausgesprochene Toxizität, die bei der Anwendung am Menschen zu Störungen der Hämoglobinsynthese, Knochenmarkschäden und zentralnervösen Symptomen mit epilepsieartigen Krankheitsbildern führt.

Kompetitive Hemmstoffe der spezifischen Histidindecaboxylase (50), wie zum Beispiel α -Methylhistidin waren im Tierversuch in vivo nur in relativ hohen Dosen wirksam, so daß sie bis heute für die Anwendung beim Menschen zu teuer sind. Es wird deshalb das Ziel dieser Arbeit sein, einen Hemmstoff für die Histaminbildung in vivo zu suchen, der nicht mit den geschilderten Nachteilen behaftet ist.

1.2.2. Methoden zur Messung der in vivo Hemmung der Histaminbildung

Folgende Methoden zur Bestimmung der Histidindecaboxylase-aktivität in vivo wurden beschrieben:

- a) Die Bestimmung der Ausscheidung von endogenem Histamin im Urin der weiblichen Ratte (28).
- b) Bestimmung der Ausscheidung von ^{14}C -Histamin und seinen Metaboliten im Urin nach Verabreichung von ^{14}C -Histidin (68).
- c) Bestimmung von ^{14}C -Histamin und seinen Metaboliten im venösen Abfluß eines Organs nach Injektion von ^{14}C -Histidin in die das Organ versorgende Arterie (46).
- d) Bestimmung von ^3H -Histamin und seinen Metaboliten in bestimmten Drüsen oder in ihren Sekreten (Speichel, Magensaft und Urin) nach Infusion von ^3H -Histidin in die zur Drüse oder zum Organ führende Arterie (19).
- e) Errechnung der Histaminbildung nach Verabreichung von ^3H -Histamin aus der Konzentration von endogenem, nicht markiertem Amin und der Abklingquote von ^3H -Histamin im Gewebe (10, 34, 35).

Mit diesen Methoden läßt sich der Einfluß von Hemmstoffen der Histidindecaboxylasen auf die Histaminbildung in vivo untersuchen. In der Tat verminderten Pyridoxinmangel und Semicarbazid, α -Methyldopa (69), α -Methylhistidin, NSD-1055 und α -Hydrazinohistidin die Histaminbildung in vivo (38). Die mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse weichen aber stark voneinander ab (37). Gründe hierfür sind nicht bekannt.

1.3. Flavonoide als entzündungshemmende und permeabilitäts-
hemmende Stoffe : potentielle Kandidaten für
Hemmstoffe der Histaminbildung

Unter dem Begriff Flavonoide werden Substanzen in Pflanzen mit der Ringgruppierung $C_6-C_3-C_6$ zusammengefaßt. Früher sprach man von Permeabilitätsfaktor bzw. Permeabilitätsvitamin (12).

Als Grundstruktur liegt den Flavonoiden im engeren Sinne das 2-Phenyl-benzo- γ -pyron zugrunde. (Abb. 2) Durch Hydroxylierung am C_3 des Flavons erhält man das Grundskelett der Flavonole. In analoger Weise kommt man vom Flavanon zum Flavanonol. Diese Flavonanalogen sind die wichtigsten Ausgangssubstanzen für biochemische und laborchemische Synthesen von hauptsächlich verwendeten Flavonoiden.

Als Arzneimittel haben von allen in der Natur vorkommenden Flavonoiden und Flavonoidglykosiden nur Quercetin, Hesperidin und Rutin größere Bedeutung erlangt. Aufgrund von Erfahrungen mit dem Permeabilitätsfaktor P im Tierexperiment an skorbutkranken Meerschweinchen wurden Flavonoidverbindungen schon bald therapeutisch bei solchen Krankheiten verordnet, die mit erhöhter Blutungstendenz infolge einer herabgesetzten Kapillargefäßresistenz oder einer gesteigerten Kapillarpermeabilität einhergehen. So wurden Erfolge von Flavonoid-Gaben bei der Oslerschen Krankheit, beim Morbus Werlhoff, bei Hämorrhagien und anderen vaskulären Komplikationen, wie z.B. bei Diabetes mellitus, berichtet. Auch wurde ein Teilerfolg bei immunpathologischen Schädigungen durch Sulfonamide, Penicillin und bei Blutungsneigung nach Antikoagulantien vom Cumarin-Typ mitgeteilt.

Die häufigste Anwendung erfahren die Flavonoide aber bei der Behandlung von Ödemen verschiedenster Genese.

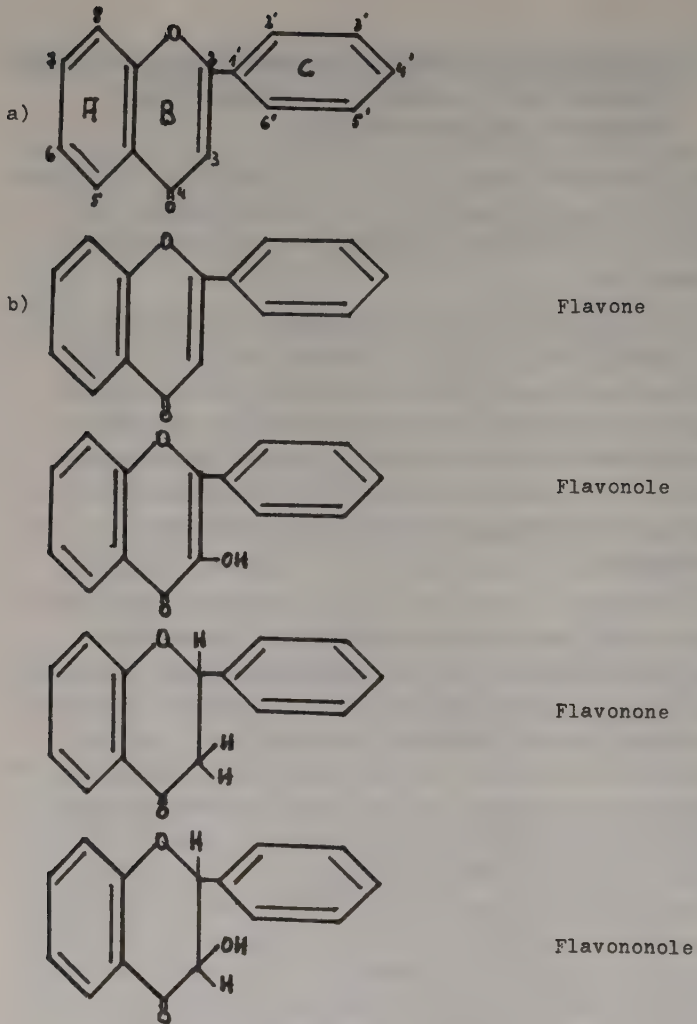


Abb. 2 : Formeln für verschiedene Grundstrukturen der Flavonoide

a) Flavon = 2-Phenyl-benzo- γ -pyron

b) Wichtige Ausgangsstrukturen für die Synthese von Flavonoiden

Für die Zellen der Gewebe stellt das kapilläre Stromgebiet den alleinigen Zugang zum strömenden Blut mit seinen Nährstoffen dar. Die Mikrozirkulation im Endstromgebiet, das als relativ autonomer Teil des Herz-Kreislaufsystems aufgefaßt werden kann, ist also für die Funktionen und Aufgaben der Zellen von lebensnotwendiger Bedeutung. Bei gesteigerter Kapillarpermeabilität, z.B. bei Verbrennung, Sepsis, etc., kommt es zu einem stärkeren Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen. Dabei wird meist auch die Strömungsgeschwindigkeit und die Mikrozirkulation verlangsamt und aus diesem Grund der Stoffaustausch zwischen Zelle und Interzellularraum erschwert. Eine Verminderung der Gefäßpermeabilität durch Flavonoide würde sich hierbei als nützlich erweisen. Da hier nun die Frage auftritt, ob die gesteigerte Gefäßpermeabilität mit Histamin in Zusammenhang steht, das ja ebenfalls diese Wirkung besitzt, wurden Flavonoide in dieser Arbeit als Hemmstoffe der Histaminsynthese untersucht.

2. Ziel der Arbeit

- 1) Zur Bestimmung der spezifischen Histidindecaboxylase des Rattenmagens sollten in Rohextrakten und nach verschiedenen Anreicherungs-schritten zwei Methoden verwendet werden, da es hinsichtlich der Zuverlässigkeit beider Verfahren noch immer unterschiedliche Auffassungen gibt.
- 2) Ein erstes Verfahren zur Anreicherung der spezifischen Histidindecaboxylase des Rattenmagens sollte entwickelt werden, da dieses Organ die unbestritten höchste Aktivität des Enzyms aufweist.
- 3) Die Wirkung von Flavonoiden auf die spezifische Histidindecaboxylase des Rattenmagens sollte geprüft werden.
- 4) Zur Frage der Spezifität der Effekte von Flavonoiden im Histaminstoffwechsel sollte deren Wirkung auf die Histaminmethyltransferase und Diaminoxidase untersucht werden.
- 5) Die Wirkung von Flavonoiden auf den Histaminstoffwechsel in vivo sollte mit der Methode der Histaminbestimmung im 24h-Urin der weiblichen Ratte ermittelt werden.
- 6) Die Wirkung von Flavonoiden auf die Streßulcusbildung der weiblichen Ratte sollte untersucht werden.

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden ausschließlich weibliche Ratten vom Stamm Ivanovas SIV 50 (180 - 220g) verwendet.

3.1.1.1. Zur Gewinnung von Magengewebe wurden pro

Versuchsreihe jeweils zehn Tiere nach einwöchiger Ernährung mit Altromin-R (Altrogge-Futtermittel Lage (Lippe)) durch Schlag auf den Kopf getötet, laparotomiert und die Mägen entnommen. Nach Abtrennen der Drüsenmägen von den Vormägen wurden die Drüsenmägen der zehn Tiere gesammelt, gewogen und mit CO₂-Schnee tiefgefroren. Meist wurden sie noch am selben Tag für die Inkubation zur Enzymbestimmung verwendet, gelegentlich wurden sie vor der Verarbeitung bei -24°C bis zu 14 Tagen tiefgefroren. Dies hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

3.1.1.2. Für die Versuche zur Histaminbildung in vivo

wurden jeweils 6 Tiere für mehrere Wochen einzeln in Stoffwechselkäfigen der Firma Süß & Schmidt KG, Kassel, untergebracht. (Abb. 3)

Dieser Käfig garantierte durch eine Urinfangglocke eine sichere Trennung von Kot und Urin und verhinderte auf diese Weise auch eine Vermischung mit Futterbestandteilen.

Die Urinfangglocke besaß zur Abflusssicherung vier sich überkreuzende Randwülste, die auf dem Becherglas zur Urinsammlung ruhten und so einen kreisförmigen Spalt zwischen Urinsammelglas und Auffangglocke freiließen. Im Becherglas wurde täglich 1 ml 12N HClO₄ vorgelegt, um den Urin (im Mittel 10-20 ml) bei saurem pH zu halten, Proteine zu

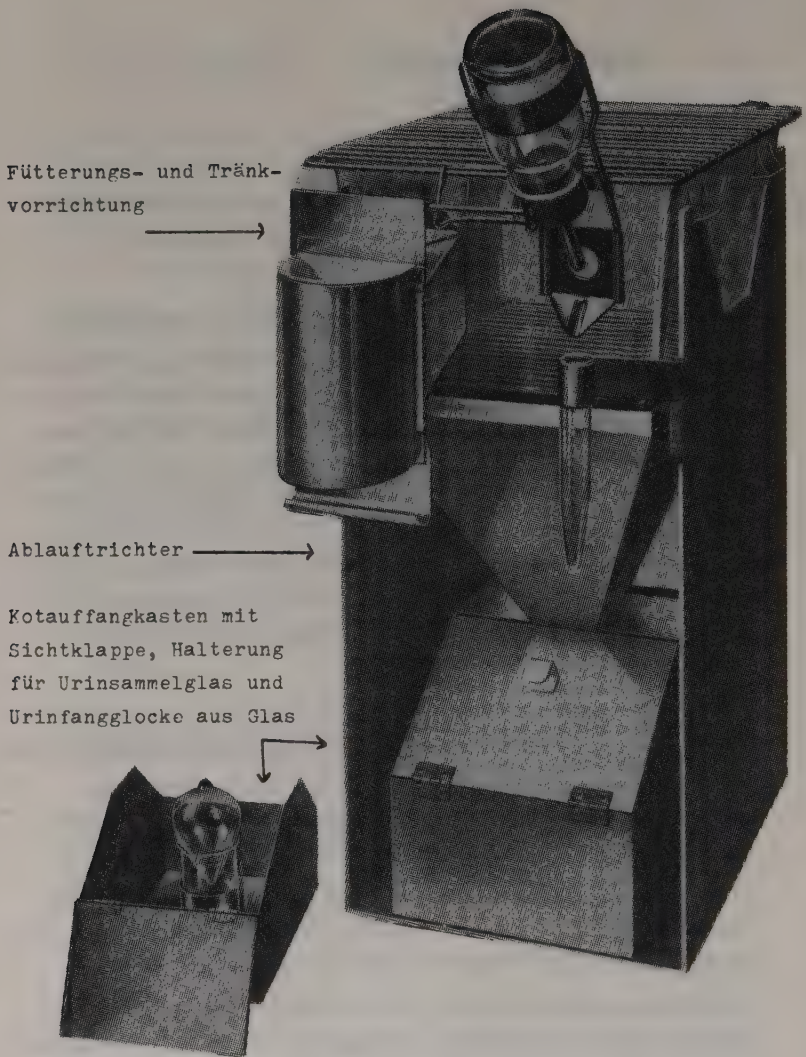


Abb. 3 : Stoffwechselkäfig zur Uringewinnung für die
Messung der Hemmung der Histaminbildung in vivo

fällen und eine für die Histaminbestimmung entsprechende Konzentration der Perchlorsäure zu erzielen. Der Verlust an Harn durch Spritzer und Vorbeilaufen über den Rand des Sammelglases wurde durch Einlaufenlassen von Kochsalzlösung (rund 3 ml) am Rand und in der Mitte des Käfigs geprüft und im Mittel auf 10 Prozent angesetzt. Hierfür, für den Kot und Futteranteil wurde aber das Becherglas in Torf eingebettet und der Käfig durch den Doktoranden täglich (auch an den Wochenenden) gesäubert.

Durch die in Abb. 3 gezeigten Vorrichtungen im oberen Teil des Käfigs wurde Trinkwasser- und Futterbeimischung zum Harn verhindert. Dies war außerordentlich wirksam bei pelletiertem Futter (Altromin), dagegen problematisch bei der von uns hergestellten histaminarmen Diät, da die Tiere sich am Kopf mit dem mehlartigen, nur mit Öl verbundenen Gemisch verunreinigten und dies mit in den Hauptraum des Käfigs brachten. Da aber der Histamingehalt dieses Futters nur 0,6 $\mu\text{g/g}$ betrug, war eine Verunreinigung des Harns mit diesem Futter zu vernachlässigen.

3.1.1.3. Auch für die Versuche zur Streßulcusbildung durch einen Gipspanzer wurden nur weibliche Ratten verwendet. Jeweils 5 Tiere wurden in geräumigen Käfigen der Firma SüBe & Schmidt KG mit entsprechend weitmaschigen Rosten untergebracht, damit die Tiere nicht ihren Kot fressen konnten. Die Geräumigkeit war notwendig, um Gruppeneffekte klein zu halten.

3.1.2. Enzympräparate

3.1.2.1. Spezifische Histidindecaboxylase aus Rattenmagen (Abb. 4)

Rohextrakte des Enzyms: Für die Inkubation von Rohextrakten der spezifischen Histidindecaboxylase wurden die Drüsenmägen von 10 Tieren (etwa 10-15 g Gewebe) mit 2 Teilen eiskühlem 0,2M Natrium-Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) homogenisiert und für 5 min bei 1800 x g zentrifugiert. Der Überstand diente als Enzymlösung.

Ultrazentrifugatextrakte des Enzyms: Zur Anreicherung der Histidindecaboxylase waren verschiedene Schritte notwendig, die zunächst eine Stabilisierung des Enzyms herbeiführen sollten. Der erste Schritt bestand darin, daß die wie oben beschriebenen Rohhomogenate für 30 min in einer Beckman-Ultrazentrifuge bei einer mittleren Beschleunigung von 150.000 xg und bei 0 - 4°C zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden vereinigt, gut gemischt und dienten als Ausgangsmaterial für die Enzymbestimmung bei weiterer Anreicherung und die weitere Reinigung.

Gelfiltration an Sephadex G 100: Bei verschiedenen Anreicherungsverfahren, wie Hitzeschritte, Fällung von Protein durch Alkohol oder Ammoniumsulfat und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose ließ sich die Enzymaktivität der UZ-Extrakte nicht erhalten. Dies wurde durch Zusätze von Substrat (L-Histidin), EDTA, p-Chlormercuribenzoat und Pyridoxal-5'-phosphat versucht. Deshalb wurde versucht, möglicherweise anwesende proteolytische Enzyme im Extrakt aufgrund ihres möglicherweise niedrigeren Molekulargewichts durch Gelfiltration an Sephadex von der spezifischen Histidindecaboxylase abzutrennen. Versuche mit Sephadex G 50 schlugen erwartungsgemäß fehl, doch Gelfiltration an Sephadex G 100 erwies sich als erfolgreich. Deshalb wurde dieses Verfahren, das

Verfahren	Vol. ml	Protein mg/ml	Spez. Aktivität pMol/min und mg	Gesamt- Aktivität pMol/min	Prozent %	Reinigung
1. Homogenat	90	71	62	396,000	100	1
2. Ultrazentrifugation (30 min bei 150.000 x g)	55	17	145	160,000	40	2,3
3. Sephadex G 100 (pH 7,0; 0,02 M Natriumphosphat- puffer)	157	3,8	324	148,000	37	5,2
4. DEAE-Zellulose (pH 7,0; 0,02 M Natriumphosphat- puffer, Konvexgrad. mit 0,2 M Phosphatpuffer)	155	0,3	1,360	96,000	24	22

Abb. 4 : Übersicht über die ersten Schritte der Anreicherung der spezifischen Histidindecaboxylase aus Rattenmagen

zu Beginn einer Reinigung ungewöhnlich ist, als Standard-methode für die weitere Anreicherung der Histidindecaboxylase verwendet. Auf mehrere Säulen mit Sephadex G 100 (2,5 x 40 cm) wurden jeweils 10 ml UZ-Extrakt aufgetragen. Die Säulen waren mit 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. Die Kühlung der Säulen, die Sammlung der Fraktionen und die Registrierung des Durchflusses mit einem UV-Lichtabsorptionsmesser (LKB 8300 Uvicorol II Spektrometer) erfolgte im Ultra-Rac der Fa. Coloria. Der Filtrationsdruck am hinteren Ende der Säule entsprach 20 cm Wasser und die Flußrate betrug etwa 40 ml/Stunde. Fraktionen von etwa 5 ml wurden gesammelt. Nachdem das Erscheinen des Enzyms im Effluat bekannt war, wurden die Fraktionen mit der Enzymaktivität vereinigt, ohne daß in jeder von ihnen das Enzym gemessen wurde, um so den Verlust an Gesamtaktivität klein zu halten. Im vereinigten Effluat wurde dann die Enzymaktivität bestimmt. Es wurde einfach bei -20°C tiefgefroren, was eine Haltbarkeit des Enzyms für ungefähr 3 Wochen gewährleistete.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose: Das Effluat von wenigstens 3 Säulen Sephadex G 100 wurde auf eine Säule mit DEAE-Zellulose (1,3 x 15 cm) aufgetragen. Die Säule war mit 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. Nachdem das Effluat aufgetragen war, wurde die Säule mit 500 ml 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen. Danach wurde das Enzym mit einem konvexen Gradienten von 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, eluiert, wobei das Mischgefäß mit konzentriertem Volumen 225 ml 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, zu Beginn des Elutionsvorganges enthielt. Die Flutionsgeschwindigkeit betrug 30 ml/h. Die optische Dichte des Eluats wurde bei 280 nm, wie oben beschrieben, kontinuierlich gemessen. Fraktionen von etwa 6 ml Volumen wurden gesammelt, auf die Enzymaktivität getestet und die Fraktionen mit Histidindecaboxylase gereinigt. Die Enzymbestimmung konnte ohne weitere Konzentrierung oder Entsalzung des Eluats erfolgen, das

Eluat war bei -20°C für etwa 14 Tage aktiv und wurde direkt für die Hemmstoffversuche verwendet. Ein Beispiel für die Anreicherung ist in Abb. 4 dargestellt. Bei einer Ausbeute von 24 % war die Anreicherung 22-fach und damit die bis heute beste Reinigung des Enzyms.

3.1.2.2. Histaminmethyltransferase aus Schweineantrum

Die Anreicherung dieses Enzyms wurde von der Arbeitsgruppe Hannes Barth nach der Methode von Lorenz et al. (53) vorgenommen. Die Präparate wurden uns für die Bestimmung der Enzymaktivität in Gegenwart der Hemmstoffe überlassen. Rohextrakte der Histaminmethyltransferase aus Schweinemagen wurden durch Homogenisieren der gefrorenen Gewebe mit zwei Teilen 0,25 M Sucrose-Lösung aufbereitet. Das Homogenat wurde bei 2°C und $100.000 \times g$ 30 min lang zentrifugiert, der Überstand wurde einer Chromatographie an DEAE-Zellulose unterworfen, wodurch ebenfalls eine etwa 20-30 fache Anreicherung gelang.

3.1.2.3. Diaminoxydasen aus Schweinedarm und Schweineniere

Die Anreicherung dieser Enzyme wurde von der Arbeitsgruppe Jürgen Kusche nach der Methode von Lorenz et al. (54) für Schweineniere und Kusche et al. (42) für Schweinedarm vorgenommen. Nach Homogenisierung wurden die Extrakte einem Hitzeschritt, einer Ammoniumsulfatfraktionierung und einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose unterworfen. Die Präparate wurden uns für die Bestimmung der Enzymaktivität in Gegenwart der Flavonoide überlassen.

3.1.3. Reagentien

Zur Bestimmung von Histamin und der Aktivität der Histidindecaboxylase:

L-Histidin (Base) und Pyridoxal-5-Phosphat (Fluka), Aminoguanidinsulfat (Schuchardt), Nicotinamid, anorganische Säuren, Basen und Puffer (Merck, Darmstadt), Sephadex G 100 (Deutsche Pharmacia), DEAE-Zellulose-SS p.a. (Serva, Heidelberg) - Histamindihydrochlorid puriss. (Fluka) - O-Phthalaldialdehyd puriss. p.a. (umkristallisiert aus Petrol-äther, S.P. 50 - 70°C) (Fluka), n-Butanol (für Chromatographie) (Riedel de Haen), n-Heptan (Uvasol, Merck), anorganische Substanzen ebenfalls als Uvasole, soweit erhältlich.

Die Glaswaren wurden mit RBS 25 (Roth) gereinigt und mehrfach mit Leitungswasser, destilliertem Wasser und zuletzt mit zweifach destilliertem Wasser gespült. Die besonders sorgfältige Auswahl von Reagentien und Reinigung der Glaswaren erwies sich als notwendig, um gute Ausbeuten bei der fluorometrischen Bestimmung von Histamin zu erzielen.

Für die Radioisotopenmethode zur Bestimmung des Enzyms wurden verwendet:

DL-14C-(carboxyl)Histidin (spezifische Aktivität 20 mCi/m mol), $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (spezifische Aktivität 10 $\mu\text{Ci/ml}$) als interner Standard (The Radiochemical Centre, Arnessham), Filterpapier Whatmann 3 MM, das zur Aufnahme von CO_2 mit Soluene (Packard) getränkt wurde, Natriumbicarbonat p.a. (Merck), Methanol, PPO und POPOP zur Herstellung des Szintillationsgemisches (Merck, Darmstadt).

Die für die Hemmstoffversuche verwendeten Flavonoide wurden alle von der Fa. Zyma-Blaes AG (München) zur Verfügung gestellt:

(+)-Catechin (MG 290.28), Catechin-2-episulfonat (MG 392), 7-Monohydroxyäthylrutosid (MG 654.59), 4',7-Dihydroxyäthylrutosid (MG 698), 5,7-Dihydroxyäthylrutosid,

3',4',7-Trihydroxyäthylrutosid (MG 742.70), Kaempferol (MG 286.24), Quercetin (MG 357), Robinetin (MG 300.25). Für die Injektion bei der Ratte wurde (+)-Catechin im abgedunkelten Erlenmeyerkolben auf 50°C in Kochsalzlösung erwärmt und in 37°C warmer Lösung verabreicht. Außerdem löste sich (+)-Catechin in Cremophor El (BASF).

Die für die Bestimmung der Histaminmethyltransferase- und Diaminoxidaseaktivität verwendeten Reagentien wurden ausführlich in den Arbeiten von Barth et al. (8, 9) und Kusche et al. (43) beschrieben. Die Diaminoxidaseaktivitäten wurden mit der ^{14}C -Putrescine methode bestimmt, da (+)-Catechin im gekoppelten optischen Test die Glutamatdehydrogenase beeinflusste. Putrescin-1,4- ^{14}C dihydrochlorid (17.8 mCi/mMol) und S-adenosyl-L-(^{14}C -methyl)-Methionin (0.51 mCi/mMol) wurden ebenfalls wie die anderen Radioisotope von The Radiochemical Centre, Arnessham, erhalten.

Für die Bestimmung der Histaminbildung in vivo bei der weiblichen Ratte wurden zwei verschiedene Futtermittel verwendet: Altromin-R (Altrogge Futtermittel Lage (Lippe)) in pelletierter Form und eine nach Gustaffson et al. (28) hergestellte histaminarme Diät in pulvrig-teigiger Form.

Die Bestandteile dieser Diät waren:

543 g CaCO_3 , 212 g KH_2PO_4 , 112 g KCl, 69 g NaCl, 16 g MgSO_4 , 25 g MgCO_3 , 20,5 g $\text{FePO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,35 g MnSO_4 , 0,9 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,085 g KJ, 0,1 g NaF, 0,17 g Kal Alaun. (Die Diätbestandteile stammen größtenteils von der Fa. Merck, Darmstadt.)

Je 12 g dieser Salzmischung wurden mit folgenden Zusätzen vermischt:

66 g Casein, 189 g Weizenstärke, 30 g Arachidisöl, 6300 I.E. Vitamin A, 1350 I.E. Vitamin D, 150 mg Vitamin E, 30 mg Vitamin K, 15 mg Vitamin B_1 , 6 mg Vitamin B_2 , 0,006 mg Vitamin B_{12} , 300 mg Vitamin C, 6 mg Pyridoxin, 30 mg Ca-Pantothenat, 60 mg Nicotinamid, 600 mg Cholin, 300 mg Inosit, 90 mg p-Aminobenzoesäure, 0,3 mg Biotin, 6 mg Folsäure.

Die für die Streßulcuserzeugung verwendeten Gipsbinden "Riplatrix" stammten von der Fa. Beiersdorf AG, Hamburg, für die Betäubung wurde Diäthyläther p.a. der Fa. Merck verwendet.

Für die Histaminbestimmung in Rattenharn wurde Dowex 50 W-X 8, H⁺, mesh 200-400 (Serva, Heidelberg) verwendet.

3.2. Methoden

3.2.1. Bestimmung der Histidindecaboxylaseaktivität mit einer Nichtisotopenmethode (Lorenz et al. (50))

Die Inkubation der Rohhomogenate, Rohextrakte und Enzympräparate nach verschiedenen Anreicherungs- und Stabilisierungsschritten erfolgte im Köttermann Schüttelbad bei 37°C und unter Stickstoffatmosphäre. Da endogenes L-Histidin in einer Konzentration von etwa 10^{-4} M sich in den Extrakten befand, wurde die Reaktion nicht durch Zugabe des Substrats, sondern durch Einbringen in das 37°C Wasserbad gestartet, nachdem die Ansätze insgesamt bei 0 - 4°C fertiggestellt worden waren.

Die Ansätze enthielten als Enzymquelle 1,0 ml Rohhomogenat bzw. Rohextrakt oder 2,0 ml Säuleneffluat bzw. Säuleneluat und 2,0 ml oder 1,0 ml Pufferlösung. Diese bestand aus 0,2 M Kalium-Natriumphosphatpuffer, pH 6,2, Aminoguanidin in $1,3 \times 10^{-4}$ M, Nicotinamid in 10^{-2} M und L-Histidin in 10^{-3} M Endkonzentration und wurde täglich frisch angesetzt. Nach Gelfiltration an Sephadex G 100 enthielt die Lösung außerdem noch Pyridoxal-5'-Phosphat in $1,25 \times 10^{-5}$ M Endkonzentration. Nach definierten Zeiten, in der Regel 5, 10, 15 min bei Rohextrakten und 10, 20, 30 min nach der Chromatographie wurde die Reaktion mit 0,5 ml 3 N HClO₄ gestoppt und das aus L-Histidin gebildete Histamin fluorometrisch nach Shore et al. (72) in der Modifikation von Burkhalter (13) bestimmt. Zur Durchführung dieser

Methode, der Definition der Blanks und der Ermittlung der Ausbeute siehe Lorenz et al. (50).

Die Enzymaktivität wurde angegeben in pMol Histaminbildung/min und mg Protein nach der Methode von Lorenz et al. (50).

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Biuretreaktion nach Weichselbaum (78) und der spektrophotometrischen Methode nach Lorenz et al. (56) bestimmt.

3.2.2. Bestimmung der Histidindecaboxylaseaktivität mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode nach Aures et al. (7/Mikromethode)

Es wurde eine Modifikation der Methode von Aures et al. (7) entwickelt, die nach unserer Ansicht einfacher ist und außerdem durch Mitführen eines internen Standards ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) und entsprechender Blanks zuverlässiger ist als die Originalmethode von Aures und Mitarbeitern.

Nachdem Frau Professor Aures, Los Angeles, anlässlich eines Besuches in Marburg dem Institut für experimentelle Chirurgie eines der von ihr entwickelten Inkubationsgefäße überlassen hatte (Abb. 5), ließen wir uns diese Apparate in Marburg herstellen. Als Verbindungsstück zwischen Inkubationsröhrchen und Austreibungs- bzw. CO_2 -Aufnahmegefäß verwendeten wir ein etwa 1 cm langes, rotes Schlauchgummiröhrchen, als Verschuß eine Kappe aus Stopfengummi mit etwa 3 mm dickem Deckelteil. Durch diese Decke konnten mit einer Hamilton-Mikrospritzenadel die Ansätze mit N_2 begast und die Trichloressig- und Bicarbonatlösung ohne Verlust an gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ appliziert werden.

Die Ansätze wurden in der Kälte hergestellt und die Reaktion durch Einbringen in die Köttermann Schüttelapparatur gestartet. Hierzu wurden die Inkubationsröhrchen durch eine Styroporplatte gesteckt, die auf dem Inkubationseinsatz fixiert wurde. Die Ansätze bestanden aus 30 μl Gewebeextrakt in Natriumphosphatpuffer (0,05 M, pH 7,0), 10 μl derselben

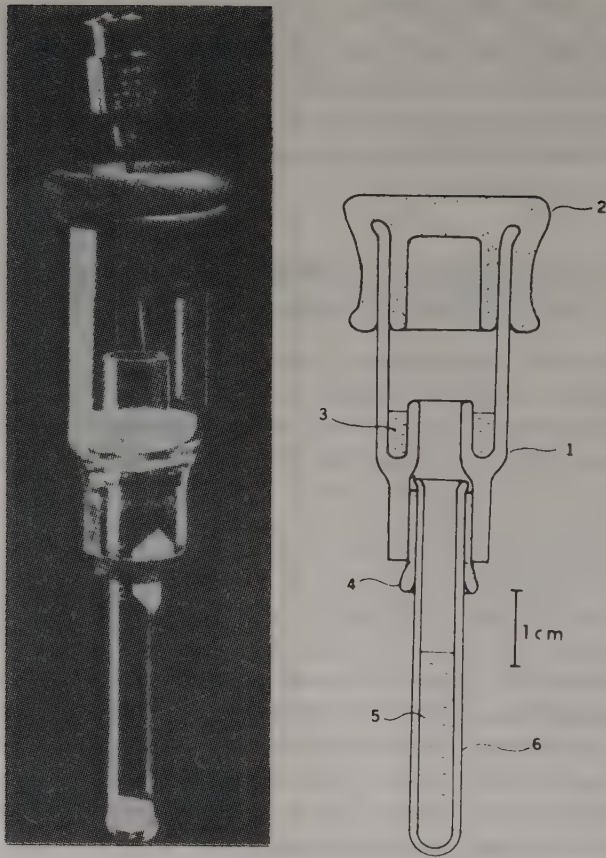


Abb. 5 : Inkubationsgefäß für die Bestimmung der
Histidindecaboxylaseaktivität (aus Aures et al. (7))

- (1) Glaskammer, an beiden Seiten offen
- (2) Gummikappe
- (3) Raum für CO₂-absorbierendes Medium
- (4) weicher Gummiring
- (5) Inkubationsmischung (50 - 200 μ l)
- (6) Glasrohr (5 cm in der Länge, 4 mm im Durchmesser)

Pufferlösung, die Aminoguanidin und Nicotinamid in der unter 3.2.1. angegebenen Endkonzentration enthielt, und 10 μ l DL-Histidin (^{14}C -Carboxyl) in einer 2×10^{-4} M Endkonzentration.

Die Reaktion wurde mit 100 μ l 10%iger Trichloressigsäure nach definierten Zeiten gestoppt (s. oben). Nach 5 min wurden 20 μ l 1 M NaHCO_3 zugegeben und der Ansatz für weitere 60 min geschüttelt. Das gebildete $^{14}\text{CO}_2$ wurde so ausgetrieben und von Soluene aufgefangen, nachdem ein 3×1 cm Filterpapierstreifen aus Whatmannpapier 3 MM vor der Inkubation im Austreibungsgefäß getränkt worden war.

Der Filter wurde mit einer Pinzette aus dem geöffneten Auffanggefäß entnommen und in ein Plastiksintillationsfläschchen der Fa. Horstmann gesteckt, das 10 ml der oben beschriebenen Szintillationsflüssigkeit enthielt (27 ml Methanol, 0,5 g PPO, 10 mg POPOP wurde mit Toluol auf 100 ml aufgefüllt). Darauf erfolgte die Zählung im Packard Tri Carb Flüssigkeitsszintillationsspektrometer.

Als interner Standard wurde $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (0.5 nCi per Ansatz = 1110 dpm) mitgeführt, das eine Bestimmung der Enzymaktivität in pMol/min $\times$ mg Protein erlaubte. Die Ausbeute und der Wirkungsgrad zusammen lagen bei dieser Methode zwischen 62 und 82 % (s. Ergebnisse). Grundsätzlich wurden zwei verschiedene Blanks vorbereitet, einer mit TCA-inaktiviertem Enzym und einer mit hitzeinaktiviertem Enzym. Die Übereinstimmung beider Blanks war vor allem nach längerer Inkubationszeit nicht immer gegeben. Dies beeinflusste aber aufgrund der hohen Enzymaktivität das Ergebnis mit weniger als 10 % und wurde deshalb vernachlässigt.

3.2.3. Radioisotopenmethode mit ^{14}C -S-Adenosyl-L-Methionin für die Bestimmung der Histaminmethyltransferase-aktivität

Die Messung der Aktivität der Histaminmethyltransferase erfolgte nach der Methode von Barth et al. (8, 9). Die Details des Verfahrens können auch in dieser Arbeit nachgelesen werden. Von S-Adenosylmethionin wird die Methylgruppe auf Histamin übertragen und dadurch das Amin biologisch inaktiviert. Das Reaktionsprodukt ^{14}C - τ -Methylhistamin wurde in ein Gemisch aus Toluol und Isoamylalkohol extrahiert. Nach Zugabe der Szintillationsmischung erfolgte die Auszählung der Ansätze im Szintillationszähler, wobei 114 cpm 1 nMol τ -Methylhistamin entsprachen.

3.2.4. ^{14}C -Putrescin-Test für die Bestimmung der Diaminoxydaseaktivität

Die Enzymaktivität wurde nach der Methode von Kusche et al. (43) bestimmt. Das Produkt des durch die Diaminoxydase abgebauten ^{14}C -Putrescin ist γ -Aminobutyraldehyd. Diese Verbindung wird quantitativ durch eine spontane, nichtenzymatische Ringbildung in Δ_1 -Pyrrolin oder seine Polymere überführt. Da das Diamin Putrescin gut wasserlöslich, die zyklischen Verbindungen und ihre Polymere gut in organischen Lösungsmitteln löslich sind, konnte eine Trennung des radioaktiven Substrats und seiner Produkte durch Extraktion der zyklischen Verbindungen in eine organische Phase erreicht werden. So war die Summe der Radioaktivität, die von der wässrigen in die organische Phase extrahiert wurde, ein Maß für die Diaminoxydaseaktivität. Die Inkubationen wurden in mit Glasstopfen versehenen Zentrifugengläsern in einem Liebisch-Thermoblock bei 37°C und Luftatmosphäre durchgeführt. Nach Stoppen der Reaktion mit Perchlorsäure folgte Extraktion und Szintillationszählung wie bei den übrigen, oben beschriebenen Verfahren.

3.2.5. Bestimmung der Histaminausscheidung im 24h-Urin der weiblichen Ratte

Während der gesamten ersten Versuchsreihe zur Histaminbestimmung im 24h-Urin der weiblichen Ratte wurden die 6 Tiere mit Altromin-R Futter und Wasser in ausreichender Menge versorgt. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit begann die tägliche Messung der Histaminausscheidung im Urin über insgesamt 16 Tage. Anschließend wurde den Tieren über einen Zeitraum von 19 Tagen (+)-Catechin in einer Dosierung von 100 mg/kg i.p. appliziert, wobei wiederum die tägliche Histaminausscheidung im Urin gemessen wurde. Nach Absetzen des Pharmakons wurde die tägliche Histaminausscheidung im Urin noch einmal über 10 Tage bestimmt.

In weiteren Versuchsreihen sollte untersucht werden, ob verschiedene Lösungsmittel für (+)-Catechin oder eine histaminarme Diät die 24h-Histaminausscheidung im Urin verändern können. Den Ratten wurde jeweils über 10-12 Tage histaminarme Diät nach Gustafsson et al. (28) verfüttert. Als Lösungsmittel für (+)-Catechin wurden in den einzelnen Versuchsabschnitten Äthanol, Kochsalzlösung (physiolog.) und Cremophor EL verwendet.

Das Volumen des täglich ausgeschiedenen Urins jedes Tieres wurde gemessen und mit der Histaminkonzentration multipliziert. Auf diese Weise wurde die Histaminmenge erhalten, die in 24 Stunden ausgeschieden wurde.

Die Histaminbestimmung im Rattenharn erfolgte nach der Methode von Lorenz et al. (52). 0,5 ml Urin wurde mit 5 N NaOH neutralisiert, mit etwa 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, verdünnt und auf eine Säule mit Dowex 50 W X-8 aufgetragen. Mit einem diskontinuierlichen Elutionsgradienten wurde Histamin schließlich eluiert, wobei es in 4 N HCl wiedergefunden wurde. Die Histaminkonzentration im Eluat wurde dann fluorometrisch nach

Kondensation mit o-Phtaldialdehyd bestimmt, wobei statt 3 N HCl eine 1 M o-Phosphorsäure zur Stabilisierung des Kondensationsproduktes verwendet wurde. Ausbeute 90 %.

3.2.6. Methoden zur Erzeugung von Streßulcera bei weiblichen Ratten

Nach zahlreichen Vorversuchen erwies sich für die Erzeugung von Streßulcera die Immobilisation der Tiere durch Eingipsen als das beste Modell. Die Ratten waren jeweils zu fünf in einem Käfig untergebracht. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde ihnen das Futter entzogen. Die Tiere wurden durch Äthernarkose betäubt und anschließend mit synthetischer Watte gefesselt. So wurden sowohl eine schmerzhaft Fesselung, als auch Unterkühlung oder etwaige Druckulcera durch den Gips verhindert.

Das Eingipsen erfolgte mit einer 150 cm langen, 10 cm breiten und auf 40°C in Wasser erwärmten Gipsrolle, die gleichmäßig um den Körper des Tieres gewickelt wurde. Das eingegipste Tier wurde solange in der Hand gehalten, bis der Gipspanzer fest war. Auf diese Weise wurden jeweils 25 Tiere einem 20h-Streß ausgesetzt.

Nach Beendigung der Immobilisation wurden die Tiere durch einen Schlag auf den Kopf getötet. Der Gipspanzer wurde mit einer Säge zerschnitten, der Magen herausgenommen, an der großen Kurvatur aufgeschnitten und auf eine Korkplatte gespannt. Nach Säuberung mit einem kochsalzhaltigen Tupfer wurden die Erosionen mit einem Auflichtmikroskop gezählt. Bei Unklarheit in der Beurteilung von Erosionen wurden histologische Schnitte angefertigt, was bei jedem Versuch 1-2mal vorkam.

Die mittlere Streßulcus Zahl wurde als der arithmetische Mittelwert von je 5 Tieren ermittelt, die sich im selben Käfig befanden.

3.2.7. Statistische Methoden

Für die Berechnung des arithmetischen Mittels, der Standardabweichung und die Anwendung des Student-t-Testes wurde ein Tischkomputer Olivetti Programme 102 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der Histidindecaboxylaseaktivität im Rattenmagen mit Hilfe der fluorometrischen Methode für Histamin und der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode

Die Bestimmung der Histidindecaboxylase mit der fluorometrischen Methode wurde mit Rohextrakt und mit teilgereinigtem Enzym durchgeführt. Im Rohextrakt verlief die Reaktion über wenigstens 15 min mit gleicher Reaktionsgeschwindigkeit (Anfangsgeschwindigkeit), während in teilgereinigten Präparaten sogar über 60 min eine lineare Kinetik erzielt wurde. Die teilgereinigten Präparate enthielten praktisch kein endogenes Histamin mehr, wodurch die Bestimmung des neugebildeten Produktes sehr erleichtert wurde.

Für die Bestimmung der Histidindecaboxylase mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode wurde die Technik von Aures et al. (7) in einigen Teilen geändert, ohne daß dabei die Inkubationsbedingungen wesentlich beeinflußt wurden. Die Ermittlung der Reaktionskinetik ergab eine Linearität über wenigstens eine Stunde, was im Gegensatz zur fluorometrischen Methode stand. Die höhere Substratkonzentration bei der fluorometrischen Methode könnte hierfür verantwortlich sein (Werle und Lorenz, 82). Entsprechend den üblichen Regeln wurde aber die Enzymaktivität als Anfangsgeschwindigkeit/Enzymmenge errechnet und damit unterschiedliche Reaktionsendzeiten verwendet.

Bei Inkubationen mit hitzeinaktiviertem Gewebe fand sich nur eine niedrige Bildungsrate von $^{14}\text{CO}_2$ als Zeichen für eine relativ geringe, nichtenzymatische Decarboxylierung während der Inkubation. (Abb. 6) Auffällig ist allerdings die unterschiedliche Höhe der Säureblanks, die von Charge zu Charge variierte. Offensichtlich führte die Markierung in der Carboxylgruppe zu einer beschleunigten Radiolyse des Histidins. Prinzipiell konnte die Aktivität der spezifischen Histidindecaboxylase der Rattenmagenschleimhaut sowohl mit der fluorometrischen als auch mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode bestimmt werden.

4.2. Anreicherung der Histidindecaboxylase aus Rattenmagen

Die Anreicherung der spezifischen Histidindecaboxylase des Rattenmagens gelang zum ersten Mal in dieser Arbeit in nennenswertem Ausmaß. Vor allen Dingen wurde eine Stabilität des Enzyms über 3-4 Wochen erreicht, die erstmals eine größere Zahl von Hemmstoffversuchen am teilgereinigten Enzym zuließ. Als Ursache der Instabilität des Enzyms wurde das Vorkommen von Proteasen im Magenrohextrakt vermutet, die eine rasche Inaktivierung des Enzyms bewirkten. So ungewöhnlich der Beginn der Reinigung mit Sephadex G 100 war, weil er möglicherweise die Reinigung größerer Enzymmengen stark limitierte, so wenig kann allerdings auch eine stärkere Denaturierung des Enzyms durch Fällungsschritte erwartet werden.

Tier Nr.	Ex- trakt ^{a)}	cpm-Werte nach verschie- denen Inkubationszeiten (min)				Ausbeute und Wirkungsgrad ^{c)}
		0 ^{b)}	15	30	60	
1	N	70	1180	2890	4470	62
	H	110	-	-	260	72
2	N	100	2270	3870	9830	64
	H	90	-	-	160	70
3	N	640	2900	3410	5690	82
	H	580	-	-	920	80

Mittelwerte aus zwei Versuchen.

a) N = nicht hitzeinaktivierter Extrakt;

H = hitzeinaktivierter Extrakt

b) säureinaktivierter Extrakt

c) $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (1110 dpm) als interner Standard

Abb. 6 : Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ von DL-Histidin (^{14}C -Carboxyl)
aus Schleimhautextrakt des Rattenmagens

4.3. Wirkung von Flavonoiden auf die spezifische
Histidindecaboxylase des Rattenmagens in vitro

4.3.1. Effekt auf die spezifische Histidindecaboxylase
im Rohextrakt ($^{14}\text{CO}_2$ -Methode)

Die Wirkung von Flavonoiden auf die Histidindecaboxylase des Rattenmagens wurde mit (+)-Catechin und 7-Monohydroxyäthylrutosid bei Rohextrakten untersucht. Das Enzym wurde durch (+)-Catechin in relativ starkem Ausmaß gehemmt, während die Hemmwirkung von 7-Monohydroxyäthylrutosid mit ca. 40 % in 10^{-3} M Konzentration nur relativ schwach war. (Abb. 7). (+)-Catechin erreichte z.B. die Hemmwirkung der Carbonylreagentien Semicarbazid und Aminoguanidin. Eine Beeinflussung des Testsystems, z.B. durch einen Farbquench, konnte in Kontrollversuchen ausgeschlossen werden. So wurde (+)-Catechin zu Blankwerten zugegeben sowie zu Werten mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ als internem Standard. Dabei verringerte sich die Zählausbeute nicht.

4.3.2. Effekt auf die spezifische Histidindecaboxylase
nach Anreicherung des Enzyms (fluorometrische
Methode)

Die Hemmung der angereicherten Histidindecaboxylase des Rattenmagens durch Flavonoide wurde anhand der Hemmung der Histaminneubildung gemessen. Im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen mit Rohhomogenat ließ sich die Hemmwirkung von 7-Monohydroxyäthylrutosid nicht mehr im selben Ausmaß wie beim Rohextrakt nachweisen, jedoch war die blockierende Wirkung von (+)-Catechin in 10^{-3} M Konzentration nahezu vollständig. In 10^{-4} M Konzentration ließ sich immer noch eine Hemmung der Histidindecaboxylase von ca. 50 % ermitteln. (Abb. 8) Somit konnte sowohl mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode als auch mit der fluorometrischen Methode eine relativ starke

Hemmstoff- konzentration (M)	Enzymaktivität in cpm/60 min Inkubation und Ansatz	
	(+)-Catechin	7-Monohydroxy- äthylrutosid
0	23800 (100%)	23800 (100%)
10^{-5}	18100 (76%)	19500 (82%)
10^{-4}	16100 (67%)	18700 (79%)
10^{-3}	6000 (25%)	14500 (61%)

Mittelwerte aus 3 Bestimmungen mit Rohextrakt.

Die %-Angaben in Klammern entsprechen der Restaktivität des Enzyms. Als Blanks wurden Ansätze mit säure- und hitzeinaktivierten Enzymen verwendet. Sie betrugen im Mittel 280 cpm/60 min und Ansatz.

Abb. 7 : Hemmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abspaltung aus ^{14}C -carboxyl-markiertem L-Histidin durch Histidindecaboxylase des Rattenmagens in Gegenwart von (+)-Catechin und 7-Monohydroxyäthylrutosid

Substanz	Hemmung in % Konzentration der Hemmstoffe [M]		
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
(+)-Catechin	100 $\pm$ 2	50 $\pm$ 6	37 $\pm$ 5
Morin	83 $\pm$ 5	46 $\pm$ 6	23 $\pm$ 3
7-Monohydroxyäthylrutosid	24 $\pm$ 2	20 $\pm$ 4	10 $\pm$ 4
4',7-Dihydroxyäthylrutosid	30 $\pm$ 4	24 $\pm$ 2	0
5,7-Dihydroxyäthylrutosid	20 $\pm$ 8	12 $\pm$ 6	0
3',4',7-Trihydroxyäthylrutosid	0	0	0
Kaempferol	13 $\pm$ 4	0	0
Quercetin	0	0	0
Robinetin	0	0	0

6 - 8 Bestimmungen mit jeder Substanz

Abb. 8: Hemmung der spezifischen Histidindecaboxylase des Rattenmagens durch verschiedene Flavonoide

Hemmwirkung von (+)-Catechin auf die Histidindecaboxylase des Rattenmagens nachgewiesen werden.

Von den übrigen untersuchten Flavonoiden war nur noch das Morin ein relativ starker Hemmstoff des Enzyms. Die im Venoruton ^(R), einem Mittel mit antioedematösem Effekt, enthaltenen Flavonoide Dihydroxy- und Trihydroxyäthylrutosid waren praktisch unwirksam, ebenso wie Kaempferol, Quercetin und Robinetin. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu Martin et al. (57), der eine Hemmwirkung von Quercetin bei der unspezifischen Histidindecaboxylase der Meerschweincheniere fand.

4.3.3. Wirkungsmechanismus der Hemmung der Histidindecaboxylase aus Rattenmagen durch (+)-Catechin

Anhand der Ableitung nach Lineweaver-Burk (45) ist der Hemmtyp von (+)-Catechin kompetitiv gegenüber L-Histidin als Substrat. (Abb. 9)

Damit inhibiert die Substanz die Histidindecaboxylase aus Rattenmagen reversibel durch Verdrängung von Histidin vom aktiven Zentrum. Dies spricht gegen eine mehr oder weniger unspezifische Hemmung des Enzyms durch (+)-Catechin und für eine möglicherweise gezielte Anwendung des Pharmakons bei Prozessen, die mit einer erhöhten Aktivität des Enzyms einhergehen.

4.4. Wirkung von Flavonoiden auf die Histaminmethyltransferase in vitro

Die Wirkung von Flavonoiden auf die Histaminmethyltransferase in vitro wurde anhand der angereicherten Histaminmethyltransferase der Schweinemagenschleimhaut untersucht. Diese Frage mußte geprüft werden, um nicht neben einer Hemmung der Histaminbildung, die die Konzentration von Histamin herabsetzt, auch durch (+)-Catechin eine Hemmung des

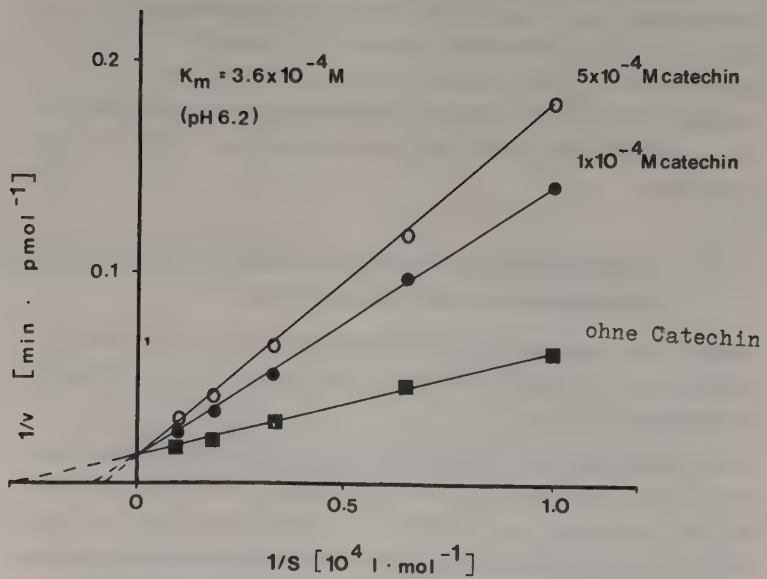


Abb. 9 : Kompetitive Hemmung der Histidindecaboxylase
des Rattenmagens durch (+)-Catechin

Histaminabbaus zu erzielen, was wiederum den gegenteiligen Effekt hervorgebracht hätte. In der Tat war (+)-Catechin im eingesetzten Konzentrationsbereich ohne Wirkung auf das Enzym. Verschiedene andere Flavonoide, die dagegen die Histidindecaboxylase nicht hemmten, erwiesen sich als Inhibitoren der Histaminmethyltransferase, so Robinetin und 5,7-Dihydroxyäthylrutosid. (Abb. 10)

Morin, das die Histidindecaboxylase hemmte, war auch ein - wenn auch geringerer - Hemmstoff der Histaminmethyltransferase. Das Ergebnis spricht für eine relativ spezifische Wirkung von (+)-Catechin im Histaminstoffwechsel, was im Folgenden noch weiter ausgeführt werden soll.

4.5. Wirkung von (+)-Catechin auf die Diaminoxydase von Schweinedarm und -niere in vitro

Durch (+)-Catechin wurden zwei Diaminoxidasen derselben Spezies in unterschiedlicher Weise beeinflusst. (Abb. 11) Für die Diaminoxydase des Schweinedünndarms erwies sich (+)-Catechin als relativ starker Inhibitor ($I.D._{50} = 8 \times 10^{-5} \text{ M}$), während es nahezu keinen Einfluß auf die Diaminoxydase der Schweineniere ausübte. Dieser Befund muß deshalb nochmals mit Diaminoxydase aus menschlichem Gewebe geprüft werden. Gegenwärtig kann noch nicht abgeschätzt werden, wie sich dieser Befund in vivo auswirkt. (+)-Catechin stellt wahrscheinlich den ersten Hemmstoff dar, der Diaminoxidasen verschiedener Herkunft so unterschiedlich beeinflusst.

4.6. Wirkung von (+)-Catechin auf die Histaminausscheidung im 24h-Urin der weiblichen Ratte

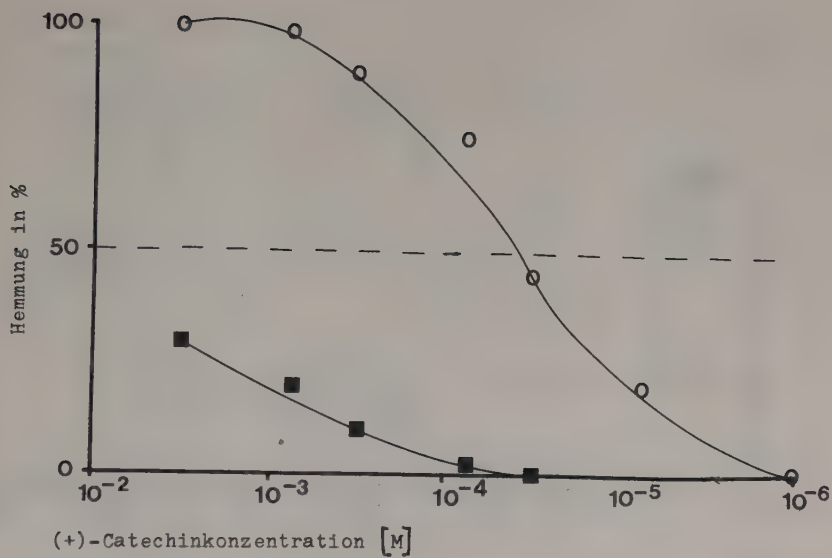
Nach der Untersuchung des Histaminstoffwechsels in vitro interessierte in besonderem Maße der Histaminstoffwechsel in vivo. In der Tat konnte in einer ersten Untersuchungsreihe eine Hemmung der Histaminbildung in vivo durch 100 mg/kg (+)-Catechin i.p. nachgewiesen werden. (Abb. 12)

Substanz	Hemmung des Enzyms in %			
	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$
(+)-Catechin	0	0	0	0
Morin	40	19	0	0
Kaempferol	46	22	17	0
Robinetin	54	40	0	0
Quercetin	21	10	0	0
7-MonoHR	28	13	0	0
7,4-Di-HR	18	8	0	0
5,7-Di-HR	65	20	13	0
Tri-HR	17	0	0	0
Tetra-HR	0	0	0	0

Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

HR = Hydroxyäthylrutosid

Abb. 10 : Hemmung der gereinigten Histaminmethyltransferase
des Schweinemagens durch verschiedene Flavonoide

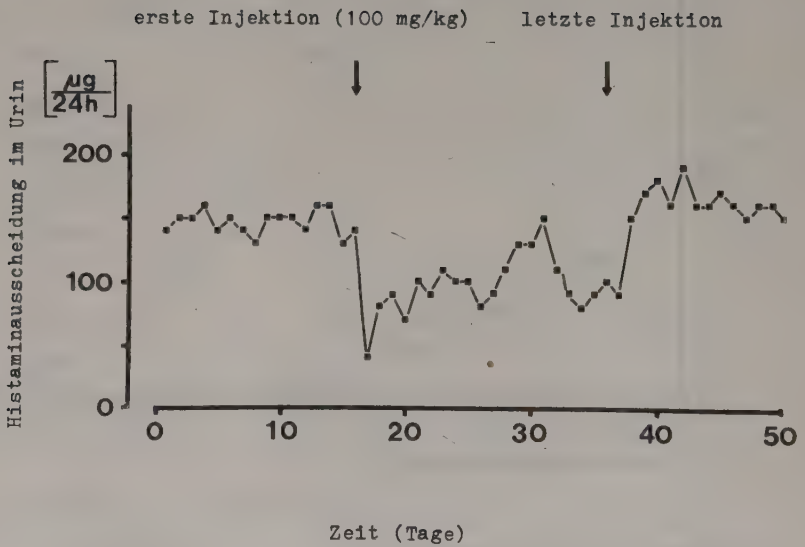


Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

O-O = Diaminoxydase von Schweinedarm

■-■ = Diaminoxydase von Schweineniere

Abb. 11 : Hemmung der Diaminoxydase von Schweinedarm
und -niere durch (+)-Catechin



Durchschnittswerte von 6 Tieren.

Abb. 12 : Histaminausscheidung im 24h-Urin der weiblichen Ratte unter der intraperitonealen Applikation von 100 mg/kg (+)-Catechin

Einen Tag nach der ersten Applikation des Flavonoids fiel die Histaminausscheidung im 24h-Urin signifikant ab (p.c. 0.005 im Student-t-Test), nach Absetzen des Pharmakons stieg sie dagegen auf den alten Wert an. (Abb. 12)

In weiteren Versuchsreihen, in denen verschiedene Bedingungen angewendet wurden, ließ sich das Ergebnis jedoch nicht in ausreichendem Maße reproduzieren. In der Mehrzahl der Experimentalserien wurde kein Effekt von (+)-Catechin in vivo nachgewiesen. (Abb. 13) Möglicherweise ist die Bestimmung der Histaminausscheidung im 24h-Urin ein zu grobes Maß für die Histaminbildung in vivo einzelner Gewebe oder Zellpopulationen, die bei bestimmten Krankheitsbildern eine Rolle spielen.

4.7. Wirkung von (+)-Catechin auf die Streßulcusbildung bei der weiblichen Ratte

Streßulcusbildung wird in direkten Zusammenhang mit einer gesteigerten Histaminbildung gebracht (Lorenz und Feifel, 51). Aus diesem Grunde untersuchten wir den Einfluß von (+)-Catechin auf die Streßulcusbildung der weiblichen Ratte. Im Gegensatz zur Histaminausscheidung im Harn war die Untersuchung der Streßulcusbildung ausgezeichnet reproduzierbar.

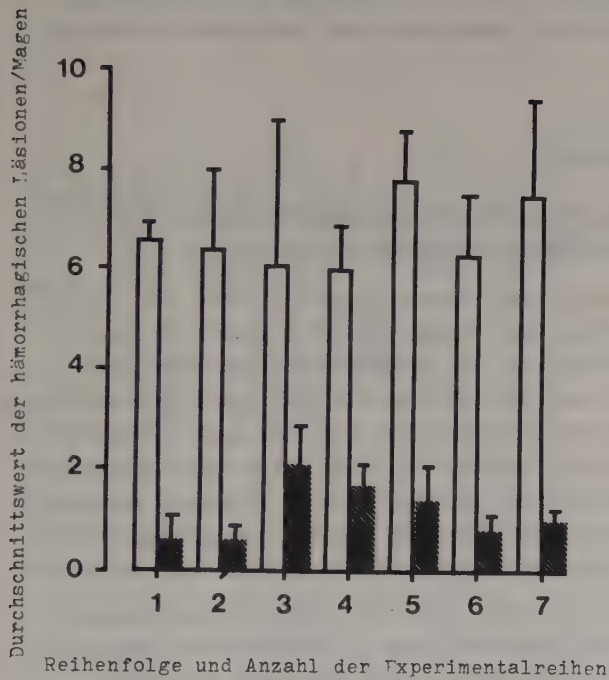
Durch die Applikation von 25 mg/kg (+)-Catechin wurde sie bei der weiblichen Ratte in hohem Maße gehemmt. Die Durchführung von 7 Serien von Experimenten in einem Zeitraum von einem halben Jahr erbrachte immer eine Verminderung der durchschnittlichen Streßulcusrate von 80 %, verglichen mit den Kontrollgruppen, wo den Tieren physiologische Kochsalzlösung injiziert worden war. (Abb. 14)

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse erscheint die Wirksamkeit von (+)-Catechin als Hemmstoff der Histaminbildung in vivo nicht mehr ausgeschlossen. Diese für die

Experimentelle Bedingungen	Anzahl der Tiere	Dosis von (+)-Catechin	Wirkung auf Histamin im Urin
Altromin R, 1 ml 10% Äthanol	6	100 mg/kg	signifikanter Anstieg
histaminarme Diät,	6	100 mg/kg	keine Wirkung
1 ml Äthanol	6	100 mg/kg	signifikanter Anstieg
histaminarme Diät,	6	25 mg/kg	keine Wirkung
1 ml Salzlösung	6	50 mg/kg	signifikanter Anstieg
	6	100 mg/kg	signifikanter Anstieg
	6	100 mg/kg	keine Wirkung
	6	200 mg/kg (Ende)	keine Wirkung
histaminarme Diät,	8	100 mg/kg	keine Wirkung
1 ml Cremophor EL	8	500 mg/kg	keine Wirkung
	8	1000 mg/kg	keine Wirkung

Die Kontroll- und Behandlungsperioden dauerten mindestens 14 Tage.

Abb. 13 : Wirkung von (+)-Catechin auf die Histaminausscheidung im 24h-Urin der weiblichen Ratte
(unter Verwendung von Normalfutter, histaminarmer Diät sowie verschiedener Lösungsmittel für (+)-Catechin)



■ (+)-Catechin 50 Tiere/Reihe
□ NaCl 5 Tiere/Käfig

Abb. 14 : Wirkung von (+)-Catechin auf die
Streßulcusbildung bei weiblichen Ratten

Klinik außerordentlich interessante Ergebnisse lassen die Möglichkeit offen, bei der bekannt geringen Toxizität von (+)-Catechin dieses beim Menschen zur Verhinderung von postoperativen hämorrhagischen Erosionen einzusetzen.

5. Diskussion

5.1. Indikationen für die Applikation von Histidin-decarboxylaseblockern beim Menschen

Zur Aufklärung verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Funktionen von Histamin im Säugerorganismus wurden in der Vergangenheit mehrere Wege beschritten, wie die Suche nach Histaminrezeptorantagonisten, Hemmstoffen der Histaminfreisetzung und Hemmstoffen der Histaminbildung. Gerade der letztere Weg wurde aber bisher vergeblich verfolgt, da unspezifische Wirkungen und eine relativ hohe Toxizität von Hydrazin- oder Hydroxylamin-derivaten die Anwendung dieser Stoffe am Menschen verboten.

Deshalb galt es, einen wirksamen, relativ spezifischen Hemmstoff der Histaminbildung in Säugerspezies zu finden, der aufgrund geringer Toxizität auch beim Menschen angewendet werden kann. Flavonoide, deren Dopadecarboxylase hemmende Wirkung bereits in den 50iger Jahren bekannt wurde (57), können hier eine Anwendung erfahren. Nach den verschiedenen Vorversuchen in dieser Arbeit kommt vor allem das (+)-Catechin in Frage, das chemisch ein Derivat des Flavanol mit 5 Hydroxylgruppen darstellt. (Abb. 15)

Die vorgelegten Ergebnisse, die durch die erstmalige Anreicherung der Histidindecaboxylase des Magens und unter Verwendung verschiedener Methoden (Fluorometrie, Isotopentechnik) unter einem beträchtlichen Arbeits- und Materialaufwand gewonnen wurden, beweisen mit großer

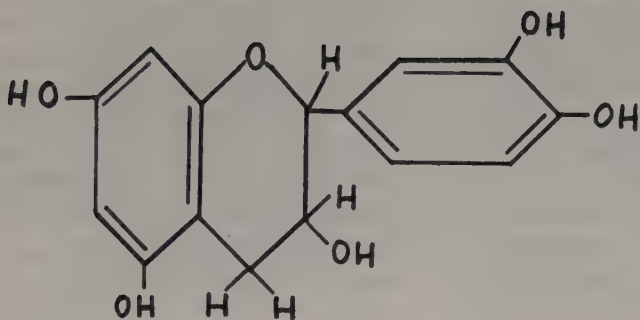


Abb 15 : Strukturformel von (+)-Catechin

Sicherheit einen neuen molekularen Angriffspunkt bestimmter Flavonoide: (+)-Catechin ist ein gegenüber Histidin kompetitiver, weitgehend spezifischer Hemmstoff der Histidindecaboxylase.

Nach den Arbeiten von Schayer (67, 68) kommt der induzierbaren spezifischen Histidindecaboxylase, die in dieser Arbeit untersucht wurde, eine große Bedeutung bei der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen (Ödeme, Verbrennungen, Streßulcera, Ischämiewirkungen, Schock, usw.) zu. Das Enzym wird als Lieferant von "intrinsic histamine" angesehen, das durch Antihistaminika nicht zu beeinflussen ist. Die Hemmung der Histidindecaboxylase durch (+)-Catechin bietet sich deshalb als eine Erklärungsmöglichkeit für seinen Effekt bei Mikrozirkulationsstörungen an, wie sie bei Streßulcera vorkommen.

5.2. Brauchbarkeit von (+)-Catechin als Histidin-decarboxylase-Hemmstoff beim Menschen

Unter dem Einfluß von Sekretionsstimulantien (39, 19, 7, 47, 49), Hormonen (47, 48, 76) und Streß verschiedener Genese (38, 67) nimmt die Aktivität der spezifischen Histidindecaboxylase in Tierversuchen erheblich zu. Auch bei fetalem -, Tumor- und reparativem Wachstum ist sie erhöht (38). Diese Aktivitätssteigerung, die mehr als das Zehnfache der Aktivität bei Normaltieren betragen kann, wurde schon seit langem auf eine Induktion der spezifischen Histidindecaboxylase zurückgeführt, weshalb das Enzym auch als "induzierbare Histidindecaboxylase" bezeichnet wurde (68). Die Aktivität der unspezifischen Histidindecaboxylase nahm unter den genannten Bedingungen nicht zu. Untersuchungen in den letzten Jahren mit Hemmstoffen der Proteinsynthese wie Puromycin und Cycloheximid haben diese Hypothese erhärtet (25, 48, 70, 71, 73).

Veränderungen des Enzymproteins, die durch Änderung von K_m ersichtlich würden, sowie coenzymbedingte Veränderungen der Enzymaktivität konnten ausgeschlossen werden (48, 52). Aktinomycin D war ohne Einfluß. Eine Induktion der spezifischen Histidindecaboxylase im ribosomalen Bereich ist deshalb wahrscheinlich. Die Frage nach der physiologischen Funktion der Histidindecaboxylasen ist nicht zu trennen von der Frage einer physiologischen Funktion des Decarboxylierungsproduktes Histamin. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt können nur zwei Funktionen für Histamin als wahrscheinlich gelten:

- 1) Stimulierung der Magensaft- und Speichelsekretion (14, 19, 39, 47, 49, 82);
- 2) Regulierung des Blutflusses im mikrozirkulatorischen System (67, 68).

Bei beiden Funktionen des Histamins kommt der spezifischen Histidindecaboxylase eine entscheidende Bedeutung zu: die Nachlieferung des unmittelbar wirksamen und rasch inaktivierten Histamins. Entsprechend beantwortet das Enzym Histaminfreisetzung aus gewebsspezifischen Histaminspeichern (sog. "Nicht-Mastzellhistaminspeichern") mit einer vermehrten Bildung von Histamin, während ein vermehrtes Angebot von Histamin zu einer Abnahme der Enzymaktivität führt (71).

Kahlson et al. haben diese Vorgänge als einen feed-back Mechanismus dargestellt (39). Der Versuch, durch andere Repressoren der spezifischen Histidindecaboxylase Veränderungen in der Funktion einzelner Organe und Gewebe zu erzeugen, stellt möglicherweise einen neuen Weg zur Aufklärung der physiologischen Funktionen von Histamin dar.

(+)-Catechin, welches die spezifische Histidindecaboxylase des Rattenmagens in beträchtlichem Ausmaß hemmt, blockiert auch in geringerem Ausmaß die Diaminoxidase und die

Monoaminoxydase des Schweinedarms. (Lorenz et al., 55).

(+)-Catechin verfügt über eine so geringe aktuelle Toxizität bei Ratte und Maus, daß es den von Gleason et al. aufgestellten Kriterien zufolge praktisch als nicht-toxisch gilt (23).

Deshalb erscheint es besonders sinnvoll, die Wirkung des (+)-Catechin auf die Histaminbildung beim Menschen in vivo zu untersuchen. Das Streßulcus z.B. stellt beim Menschen noch immer eine bedrohliche Krankheit dar, mit einer Letalität von etwa 80 % (Abb. 16). Zur Prophylaxe sollte deshalb in einer kontrollierten Studie (+)-Catechin bei Menschen auf der Intensivpflegestation geprüft werden, was in der Tat in der Chirurgischen Universitäts-Klinik noch in diesem Jahr begonnen werden soll.

Anzahl der Patienten mit akuten Verstorbenen Läsionen		Inzidenz %	Literatur
I	II	I / II	
83	7	8,4	Desmond et al. 1972
168	15	8,9	Palmer 1970
88	18	20,5	Himal et al. 1975
19	7	36,8	Müller et al. 1967
43	30	69,2	Crawford et al. 1971
24	17	71,0	Goodmann und Frey 1968
22	16	72,7	Jenny et al. 1968
323	284	77,0	Pruitt et al. 1970
61	48	84,2	Grosz u. Wu 1967
61	17	69,2	Median
(22 - 168)	(7 - 48)	(8,9 - 77,0)	(1. - 3. Quartil)

Abb. 16 : Letalität akuter, gastroduodenaler Läsionen
(Streßulcera)

6. Zusammenfassung

- 1) Es wurde untersucht, welche Möglichkeiten bestehen, über die Blockierung von Enzymen Einfluß auf den Histaminstoffwechsel zu nehmen. Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Wirkung von Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide auf die Enzyme Histidin-decarboxylase, Histaminmethyltransferase und Diaminoxidase.

Es zeigte sich, daß besonders (+)-Catechin als relativ spezifischer Blocker der spezifischen Histidin-decarboxylase gelten muß, weil (+)-Catechin in sämtlichen Versuchen eine starke Hemmung dieses Enzyms aus Rattenmagen zeigte, bei geringerer Hemmung der Diaminoxidase und der Monoaminoxidase des Schweinedarms und bei fehlender Hemmung der Histaminmethyltransferase in vitro.

- 2) Die Messung der Enzymaktivität wurde mit zwei verschiedenen Bestimmungsmethoden durchgeführt, der fluorometrischen und der $^{14}\text{CO}_2$ -Methode. Dabei zeigte sich, daß die durch die fluorometrische Methode gewonnenen Ergebnisse durch die mit radioaktiv markiertem Histidin durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden konnten.
- 3) Anhand der Ableitung nach Lineweaver-Burk ist der Hemmtyp von (+)-Catechin kompetitiv gegenüber L-Histidin als Substrat, das bedeutet Blockierung durch Verdrängung von Histidin am aktiven Zentrum.
- 4) Die Histidin-decarboxylase aus Rattenmagen wurde durch verschiedene Reinigungsverfahren wie Ultrazentrifugation, Gelfiltration an Sephadex G 100, sowie Chromatographie an DEAE-Zellulose erstmals insgesamt 22-fach angereichert. Dies gelang durch die erstmalige Stabilisierung des Enzyms, die über 4 Wochen ohne Aktivitätsverlust andauerte.

- 5) Der Beweis für eine inhibitorische Wirkung von (+)-Catechin auf den Histaminstoffwechsel in vivo konnte anhand der Bestimmung der Histaminausscheidung im 24h-Harn nicht mit Sicherheit erbracht werden, da die Ergebnisse nicht in ausreichendem Maß reproduzierbar waren.

Dagegen war die Wirksamkeit von (+)-Catechin als Hemmstoff der Streßulcusbildung bei denselben Ratten ausgezeichnet reproduzierbar. Die Verminderung der durchschnittlichen Streßulcusrate betrug 80 %. Es wird deshalb geschlossen, daß möglicherweise die Messung der Histaminausscheidung im 24-Stunden Harn ein zu grobes Maß darstellt, um die Hemmung der Enzyme in vivo in einzelnen Organen zu messen. Die Ergebnisse in den Tierversuchen sind so vielversprechend, daß eine kontrollierte Studie am Menschen bei der Prophylaxe von Streßulcera in der Wachstation empfohlen wird.

Literaturverzeichnis

- 1) ABDEL LATIF A.A., ALIVASATOS S.G.:
Alternative Pathways of enzymatic formation of
ribotides and ribosides of histamine.
Biochem. Biophys. Acta 51, 398-400 (1961)
- 2) ACKERMANN D.:
Über den bakteriellen Abbau des Histidins
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 65, 504. (1910)
- 3) ACKERMANN D.:
Über das Vorkommen von Homarin, Trigonellin und einer
neuen Base Anemonin in der Anthozoe Anemonia sulcata
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 295, 1 (1953)
- 4) ACKERMANN D., JANKA R.:
Konstitution und Synthese des Anemonins
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 294, 93-97 (1953)
- 5) ALIVASATOS S.G.A.:
Formation of histamine containing dinucleotids by
enzymatic reaction of histamine and coenzyme.
1. Nature (London) 181, 271-272 (1958)
- 6) ALIVASATOS S.G.A.:
Histamin-Pyridincoenzymwechselwirkungen
Handbuch der experimentellen Pharmakologie,
Springer Verlag (1966)
- 7) AURES D., DAVIDSON W.D., HÅKONSON R.:
Histidindecaboxylase in gastric mucosa of various
mammals.
European J. Pharm. 8, 100-107 (1969)

- 8) BARTH H., LORENZ W., NIEMEYER I.:
Inhibition and Activation of Histamine Methyltransferase
by Methylated Histamines.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1021-1026 (1973)
- 9) BARTH H., NIEMEYER I., LORENZ W.:
Studies on the mode of action of histamine H_1 - and
 H_2 -receptor antagonists on gastric histamine
methyltransferase.
Agents and Actions, 3/3, 138-147 (1973)
- 10) BEAVEN M.A., HORAKOVA Z., JOHNSON H.L., ERJAVEC F.,
BRODIE B.B.:
Selective labeling of histamine in rat and gastric
mucosa.
Fed. Proc. 26, 233-236 (1967)
- 11) BEST CH.H.:
The disappearance of histamine from untoylinsing
Inng tissue.
J. Physiol. 67, 256 (1929)
- 12) BÖHM K.:
Die Flavonoide
Editio Cantor KG-Aulendorf/Württ. 10-11 (1967)
- 13) BURKHALTER A.:
Histamine formation by the fetal rat liver.
Bioch. Pharmacol. 11, 315-322 (1962)
- 14) CODE C.F.:
Histamine and gastric secretion: A later look 1955-1965
Fed. Proc. 24, 1311 (1965)

- 15) CRAWFORD F.A., HAMMON J.W.:
The stress ulcer syndrome
Amer. J. Surg. 121, 644 (1971)
- 16) CROWLEY G.M.:
Enzymatic synthesis of imidazole acetic acid ribotide.
Fed. Proc. 19, 309 (1960)
- 17) DALY J.W., WITKOP B.:
Neuere Untersuchungen über zentral wirkende endogene
Amine.
Angew. Chemie 75, 552-572 (1963)
- 18) DESMOND A.M., REYNOLDS K.W.:
Erosive gastritis: its diagnosis, management and
surgical treatment
Brit. J. Surg. 59, 5-13 (1972)
- 19) ERJAVEC F., BEAVEN M.A., BRODIE B.B.:
Uptake and release of ^3H -histidine in cat submandibular
gland.
Fed. Proc. 26, 237-240 (1967)
- 20) ERSPAMER V., VITALI F., ROSEGHINI M., CEI J.M.:
Occurrence of new imidazolealkylamines (spinaceamine
and 6-methyl-spinaceamine) and skin extracts of
Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus.
Experimentia (Basel) 19, 346-347 (1963)
- 21) EUSTIS A.C.:
The detoxicating effect of liver of cathartes aura
upon solutions of β -imidazolyl-ethylamine.
Biochem. Bull. 4, 97 (1915)

- 22) FERNANDES J.F., CSATELLANIN O.V., PLESE M.:
Biosynthesis of histamine ribotide and imidazolacetate
ribotide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 679 (1960)
- 23) GLEASON M.N., GOSSELIN R.E., HODGE H.C.:
Clinical toxicology of commercial products
Williams and Williams Comp., Baltimore 1963
- 24) GOODMAN A.A., FREY CH.F.:
Massive upper gastrointestinal hemorrhage following
surgical operations
Ann. Surg. 167, 180-184 (1968)
- 25) GRAHN B., HUGHES R., KAHLSON G., ROSENGREN E.:
Retardation of protein synthesis in rat fetal liver
on inhibitory rate of histamine formation.
J. Physiol. (London) 200, 677-685 (1969)
- 26) GROSZ C.R., WU K.T.:
Stress ulcers: A surgery of the experience in a large
general hospital
Surgery 61, 853-857 (1967)
- 27) GUGGENHEIM M.:
Die biogenen Amine.
S. Karger, Basel-New York 469-475 (1950)
- 28) GUSTAFSSON B., KAHLSON G., ROSENGREN E.:
Synthesis of histamine studied by its distribution and
urinary excretion in germ free and not germ free rats
fed histamine free diet.
Acta physiol. scand. 41, 217-228 (1957)
- 29) HEISE R., HOLZ P.:
Über die Bildung von Histamin im Organismus
Naturwissenschaften 25, 201 (1937)

- 30) HIMAL H.S., WATSON W.W., JONES C.W., MacLEAN L.D.:
The management of bleeding acute gastric erosions:
the role of gastric hypothermia
Brit. J. Surg. 62, 221-223 (1975)
- 31) HOLZ P.:
Über die Entstehung von Histamin und Thyramin im
Organismus
Klin. W.schr. 45, 1561-1567 (1937)
- 32) ITO R., ITO T., NAHAZAWA K.:
Biochemical studies on histamine, V: Alanine formation
resulting from transamination from histamine to pyruvic
acid.
Nippon Univ. J. Med. 2, 259-273 (1960)
- 33) JENNY M., TRÄBERT E., BIRCHER J., AKOVBIANTZ A.:
Das akute postoperative gastroduodenale Streßulcus
Schweiz. med. W.schr. 98, 1507-1512 (1968)
- 34) JOHNSON H.L.:
Nonmast-cell histamine kinetics 1.
Decline of ^3H -histamine in tissues of the female rat.
Life Sci. 7, 1041-1050 (1968)
- 35) JOHNSON H.L.:
Nonmast-cell histamine kinetics 2.
Effects of histidine decarboxylase inhibitors on
rates of decline of tissue ^3H -histamine in the
female rat.
Biochem. Pharmacol. 18, 651-658 (1969)
- 36) JONES O.W., ASHTON D.M., WYERGAARDEN J.B.:
J. Clin. Invest. 41, 1805 (1962)

- 37) JOHNSTON M., KAHLSON G.:
Experiments on the inhibition of histamine formation
in the rat.
Brit. J. Pharmacol. 30, 274-282 (1967)
- 38) KAHLSON G., ROSENGREN E.:
New approaches to the physiology of histamine.
Physiol. Rev. 48, 156-191 (1968)
- 39) KAHLSON G., ROSENGREN E., SVAHN D., THUNBERG R.:
Mobilisation and formation of histamine in the
gastric mucosa as related to acid secretion.
J. Physiol. (London) 174, 400-416 (1964)
- 40) KAPPELLER-ADLER R., IGGO B.:
Histamine and its derivatives in human urine.
Biochem. Biophys. Acta 25, 394-402 (1957)
- 41) KARJALA S.A.:
The partial characterization of a histamine metabolite
from rat and mouse urine.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 504-505 (1955)
- 42) KUSCHE J., RICHTER H., SCHMIDT J., HESTERBERG R.,
FRIEDRICH A., LORENZ W.:
Diamine Oxidase in Rabbit Small Intestine: Separation
from a Soluble Monoamine Oxidase, Properties and
Pathophysiological Significance in Intestinal Ischemia.
Agents and Actions (in press)
- 43) KUSCHE J., RICHTER H., HESTERBERG R., SCHMIDT J.,
LORENZ W.:
Comparison of the ^{14}C -Putrescine Assay with the NADH
Test for the Determination of Diamine Oxidase: Description
of a Standard Procedure with a High Precision and an
Improved Accuracy.
Agents and Actions 3/3, 148-156 (1973)

- 44) LINDAHL K.M.:
On the biological methylation of histamine.
3. Acta Chem. Scand. 12, 2050 (1958)
- 45) LINEWEAVER H., BURK A.:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- 46) LINDELL S.E., SCHAYER R.N.:
Formation of histamine in the kidney of the dog.
Brit. J. Pharmacol. 13, 89-94 (1958)
- 47) LORENZ W., PFLEGER K.:
Stoffwechsel und physiologische Funktion von Histamin
im Magen.
Klin. Wschr. 46, 57-71 (1968)
- 48) LORENZ W., GERANT M., WERLE E.:
Induction of the specific histidine decarboxylase
by TSH and 2-mercaptobenzimidazole-1,3-dimethylol.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 260
171 (1968)
- 49) LORENZ W., HAUBENSACK G., HUTZEL M., WERLE E.:
Histaminliberierung in Glandula submaxillaris und
Pankreas durch Parasympaticomimetica, Peptidhormone,
Histamin und Mepyramin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 260
116-137 (1968)
- 50) LORENZ W., HALBACH St., GERANT M., WERLE E.:
Specific histidine decarboxylase in the gastric mucosa
of man and other mammals: determination, location and
properties.
Biochem. Pharm. 18, 2625 (1969)

- 51) LORENZ W., FEIFEL G.:
Neue Gesichtspunkte zur Pathogenese des Streß- und Steroidulcus.
DMW 25, 1848-1850 (1970)
- 52) LORENZ W., BENESCH L., BARTH H., MATEJKA E., MEYER R., KUSCHE J., HUTZEL M., WERLE E.:
Fluorometric assay of histamine in tissues and body fluids: choice of the purification procedure and identification in the nanogram range.
Z. Analyt. Chem. 252, 94-98 (1970)
- 53) LORENZ W., REIMANN H.J., BARTH H., KUSCHE J., MEYER R., DOENICKE A., HUTZEL M.:
A sensitive and specific method for the determination of histamine in human whole blood and plasma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 911-920 (1972)
- 54) LORENZ W., BARTH H., KUSCHE J., REIMANN H.J., SCHMAL A., MATEJKA E., MATHIAS Ch., HUTZEL M., WERLE F.:
Histamine in the pig. Dtermination, distribution, release and pharmacological actions.
Europ. J. of Pharmacol. 14, 155 (1971)
- 55) LORENZ W., REIMANN H.J., KUSCHE J., BARTH H., SCHMAL A., NUSIME H., SCHÜLLE G., FROELICH R., SCHMIDT J., RAABF R.:
Effects of (+)-Catechin on several Enzymes of Histamine Metabolism and on Stress Ulcer Formation in the female rat.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. of Pharmacol. Suppl. 287, 62 (1975)
- 56) LOWRY O.H. ROSFERUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.:
Protein measurement with the Folin-phenol reagent.
J. Biol. Chem. 153, 265 (1950)

- 57) MARTIN G.J., GRAFF M., BRENDEN R., BEILER J.M.:
Effect of vitamin P compounds on the action of
histidine decarboxylase.
Arch. Biochem. 21, 177-180 (1949)
- 58) MEISTER A.:
Biochemistry of the Amino Acids.
Second edition p. 836, Academic Press, New York-
London (1965)
- 59) MILLICAN R.C., ROSENTHAL S.M., TABOR H.:
On the metabolism of histamine. A: Urinary excretion
following oral administration. B: Conjugation in
vitro.
J.Pharm. exper. Therap. 97, 4-13 (1949)
- 60) MÜLLER E., SALLER R., KREMER K.:
Das akute gastroduodenale Streßulcus in der Chirurgie.
DMW 92, 516-522 (1967)
- 61) MURAOKA S., INOUE M., YAMASAKI H.:
Enzymatic formation of histamine ribotide from
histamine dinucleotide.
Nature 190, 532-533 (1961)
- 62) NAKAYIMA T., SANO I.:
A metabolite of histamine: 4(5)-Imidazol-ethane-2-ol.
Biochem. Biophys. Acta 82, 260 (1964)
- 63) PALMER E.D.:
Upper gastrointestinal hemorrhage.
Ch.C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois (1970)
- 64) PRUITT B.A., FOLEY F.D., MONCRIEF J.A.:
Curling's ulcer: A clinical-pathology study of
233 cases.
Ann. Surg. 172, 523-536 (1970)

- 65) ROBINSON J.D., GREEN J.P.:
Presence of imidazoleacetic acid riboside and
ribotide in rat tissues.
Nature (London) 203, 1178-1179 (1964)
- 66) SCHAYER R.W.:
Catabolism of physiological quantities of histamine
in vivo.
Physiol. Rev. 39, 116-126 (1959)
- 67) SCHAYER R.W.:
Induced synthesis of histamine, microcirculatory
regulation and the mechanism of action of the
adrenal glucocorticoid hormones.
Progr. Allergy (Basel) 7, 187-212 (1963)
- 68) SCHAYER R.W.:
Enzymatic formation of histamine from histidine.
In: Histamine and Antihistaminics.
Handb. experim. Pharmacol. Vol. XVIII, 1, 688-725
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
- 69) SCHAYER R.W., SESTOKAS E.:
Suppression of histamine synthesis in guinea pigs
by α -methyl-3,4-dihydroxyphenylalanine.
Biochem. Biophys. Acta 111, 557-558 (1965)
- 70) SCHAYER R.W., REILLY M.A.:
Suppression of inflammation and histidine decarboxylase
by protein synthesis inhibitors.
Amer. J. Physiol. 215, 472-476 (1968)
- 71) SCHWARTZ J.C., RONNE A.L., COHEN Y., VALETTE G.:
Histamine formation in rat stomach: Study of
regulation mechanisms.
Europ. J. Pharm. 5, 272-278 (1969)

- 72) SHORE P.A., BURKHALTER A., COHN V.H.jr.:
A method for the fluorometric assay of histamine
in tissues.
J. Pharmacol. exp. Therap. 127, 182-186 (1959)
- 73) SNYDER S.H., EPPS L.:
Histidine decarboxylase in rat stomach: Mechanisms
of its activation by gastrin.
Fed. Proc. 26, 786 (1967)
- 74) TABOR H.:
Metabolic studies on histidine, histamine and
related imidazoles.
Pharmacol. Rev. 6, 299 (1954)
- 75) TABOR H., HAYAISHI O.:
The excretion of imidazoleacetic acid riboside
following the administration of imidazoleacetic
acid or histamine to rats.
J.Amer. Chem. Soc. 77, 505 (1955)
- 76) TELFORD J.H., WEST G.B.:
Some effects of corticosteroids on the metabolism
of histamine and 5-hydroxytryptamine in the rat.
Brit. J. Pharmacol. 16, 360-368 (1961)
- 77) URBACH K.F.:
Nature and probable origin of conjugated histamine
excreted after ingestion of histamine.
Proc. Soc. exp. Biol. (New York) 70, 146-156 (1949)
- 78) WEICHSSELBAUM T.E.:
Protein estimation by biuret method.
Amer. clin. Path. 10, 40 (1946)

79) WERLE E.:

Über die Bildung von Histamin aus Histidin durch
tierisches Gewebe.

Biochem. Z. 288, 292-293 (1936)

80) WERLE E.:

Bildung und Abbau biogener Amine.

Angewandte Chemie 56, 141-156 (1943)

81) WERLE E., PALM D.:

Histamin in Nerven, III. Mitteilung

Biochem. Z. 323, 255-264 (1952)

82) WERLE E., LORENZ W.:

Speicheldrüsensekretion nach Pilocarpin, Histamin
und Kininen.

Arch. Int. Pharmacodyn. Therap. 161, 477-488 (1966)

83) ZELLER E.A.:

Über den enzymatischen Abbau von Histamin und
Diaminen.

Helv. Chem. Acta 21, 880-890 (1938)

D a n k s a g u n g

Herrn Prof. Dr. med. Wilfried Lorenz, meinem Doktorvater, danke ich für die Überlassung des Themas, seinen hilfreichen Rat und die bereitwillige Betreuung bei dieser Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Hannes Barth, Herrn Dr. med. Jürgen Kusche, Herrn Dr. med. Jürgen Reimann und Herrn Anton Schmal für die freundschaftliche Mithilfe und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 5. Juli 1949 wurde ich in Haina/kloster als Sohn der Eheleute Ursula und Hermann Nusime geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Grundschule in Haina/Kloster und wechselte dann auf das Gymnasium "Edertalschule" nach Frankenberg/Eder, wo ich 1968 das Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ablegte.

Zum Wintersemester 1968/69 begann ich das Medizin-studium an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn, wo ich am 15. Juli 1974 auch das Staatsexamen ablegte.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich in der Universitäts-Frauenklinik in Marburg/Lahn sowie im Kreiskrankenhaus Frankenberg/Eder, wo ich seit dem 1. August 1975 als Assistenzarzt zunächst in der Chirurgischen Abteilung und seit dem 1. Januar 1976 in der Gynäkologisch-Geburtshilflichen Abteilung tätig bin.

Seit Juli 1974 bin ich mit der Studienrätin z.A. Hannelore Schwarz verheiratet.

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität
in Marburg/Lahn waren die Herren Professoren und
Dozenten:

Amon, Aurich, Berendes, Bommer, Braasch, Brück, Buchholz,
Daume, Dehnicke, Dimroth, Dölle, Fissner, Engelhardt,
Exner, Friedrich, Ganz, Golenhofen, Graul, Hamelmann,
Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hort, Jakob,
Karlson, Klaus, Köbler, Koecke, Korb, Kühnel, Linneweh,
Mann, Martini, Nesswetha, Petry, Pots, Reim, Remschmidt,
Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmidt, Schmitz-Moormann,
Seidel, Siegert, Straub, Thoenes, Uhlarik, Walcher,
Wehrmeyer.

